



**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**

**Desarrollo y caracterización de aptámeros de RNA y DNA
frente a la proteína ErbB3 binding protein-1
mediante procedimientos de selección y evolución *in vitro*.**

**TESIS DOCTORAL
Eva María Lanagrán Valero
Octubre 2016**



**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**

**Desarrollo y caracterización de aptámeros de RNA y DNA
frente a la proteína ErbB3 binding protein-1
mediante procedimientos de selección y evolución *in vitro*.**

**Memoria presentada por Eva María Lanagrán Valero para optar al
grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.**

Madrid, Octubre de 2016.



El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Evolución Molecular del Centro de Astrobiología (centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial, asociado al *NASA Astrobiology Institute*), bajo la dirección del Dr. Carlos Briones Llorente y del Dr. Miguel Moreno Molina.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una Ayuda para la Formación de Personal Investigador (FPI) “Rafael Calvo Rodés” concedida por el Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial.

A mis seres queridos.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil recoger en pocas líneas a todas las personas que me han apoyado durante este tiempo, así que mis disculpas de antemano a quienes no se vean aquí reflejados.

Gracias a mi Director, el Dr. Carlos Briones, por haberme dado la oportunidad y confianza de embarcarme en este proyecto. Junto a él, gracias también a mi Codirector, el Dr. Miguel Moreno, así como a María Fernández y a la Dra. Ana García. Gracias por vuestra ayuda, vuestro tiempo, vuestros conocimientos y, en general, por todo lo que he aprendido gracias a vosotros.

Gracias a mi tutor en la UAM, el Dr. Manuel Soto, por su interés a lo largo de este proyecto y por resolver todas mis dudas.

Gracias a todos los que han colaborado en el desarrollo de esta Tesis: a la Unidad de Secuenciación y Genómica del CAB, al grupo de la Dra. Encarnación Martínez Salas (CBMSO), al grupo de la Dra. Susanna Manrubia (CAB, actualmente en el CNB), al grupo del Dr. Víctor González (HRC) y al grupo del Dr. José Ángel Martín Gago (CAB e ICMM).

Gracias a todas las personas con las que compartí mi día a día en el CAB: Laura, Paola, Kirina, Mara, Ester, Marina, Rosa, Miguel, Javi, Antonio y un largo etcétera imposible de nombrar.

Gracias a Manuel. Muchísimas gracias por esa sonrisa día tras día a las 6:45, por hacer más llevaderas las idas y venidas (a pesar de Radiolé) y por ser tan buen amigo y mejor persona.

Gracias a mis amigos, por ser un punto de apoyo durante esta Tesis. Alberto G., Ismael, Olmo, Alberto P., Emilio, José, Raquel, Noelia, Miguel, Conchi, Juan Antonio, Cristina, Carmen, gracias por vuestra confianza, vuestros consejos y, sobre todo, vuestro tiempo. En especial, gracias a ti, Chechu, por tu sincera amistad, tu honestidad...en resumen, por ser como eres. Como sueles decir tú: “Gracias por seguir ahí, amigo”.

Gracias a Loren. Mi más sincera gratitud por estar siempre ahí, por tu apoyo, por escucharme tantas y tantas veces, por tus consejos y por toda tu ayuda. Gracias por ser un amigo con mayúsculas.

Y por encima de todo, doy gracias a mi familia, por su incondicional cariño, apoyo y sacrificio. Gracias Mamá y Papá, por inculcarme vuestros valores y por respaldar todas mis decisiones. Gracias Pedro, Abuelitos (sobre todo a quienes me echáis una mano desde Arriba) y, cómo no, a Emma, por haber traído y contagiar tu alegría y felicidad. Sin vosotros no hubiese llegado hasta aquí. Mi más sincera admiración, cariño y agradecimiento.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	19
RESUMEN / SUMMARY	21
Resumen	21
Summary	22
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. EL ORIGEN Y LA EVOLUCIÓN TEMPRANA DE LA VIDA.....	25
1.2. EL MODELO DEL “MUNDO RNA”	28
1.3. SELECCIÓN Y EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS <i>IN VITRO</i>	33
1.4. APTÁMEROS.....	36
1.4.1. Características de la unión de los aptámeros a sus ligandos	36
1.4.2. Los aptámeros como herramientas biotecnológicas: comparación con los anticuerpos	38
1.4.3. Aptámeros de DNA <i>versus</i> aptámeros de RNA	39
1.4.4. Características de la población inicial.....	43
1.4.5. Sistemas de selección de aptámeros con el fenotipo deseado.....	46
1.4.6. Métodos de amplificación de las moléculas seleccionadas	47
1.4.7. Análisis de las secuencias y estructuras obtenidas	48
1.4.8. Variantes del sistema SELEX	50
1.4.9. Modificación y estabilización de aptámeros	55
1.5. COMPARACIÓN ENTRE SELECCIÓN Y EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS <i>IN VITRO</i>	56
1.6. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS PARA ANALIZAR LA SELECCIÓN Y EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS <i>IN VITRO</i>	61
1.7. APTÁMEROS ESPECÍFICOS FRENTE A PROTEÍNAS	64
1.8. MÉTODOS PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN APTÁMERO-PROTEÍNA.....	67
1.9. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN APTÁMERO-PROTEÍNA.....	70
1.10. APTASENORES.....	71
1.11. EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA (<i>FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS</i> , FMDV).....	73
1.11.1. Biología del FMDV	73
1.11.2. El elemento IRES de FMDV	76
1.12. PROTEÍNA EBP1 Y SU INTERACCIÓN CON EL ELEMENTO IRES DE FMDV	78
2. OBJETIVOS	81
3. MATERIALES Y MÉTODOS	85
3.1. MATERIALES	87
3.1.1. Reactivos químicos generales y material de laboratorio	87
3.1.1.1. Reactivos	87
3.1.1.2. Material de laboratorio (por orden alfabético)	88
3.1.2. Oligonucleótidos	89
3.1.3. Enzimas y kits para amplificación de ácidos nucleicos	90
3.1.4. Medios de cultivo y kits de clonaje en <i>E. coli</i>	91

3.1.5. Kits de extracción y secuenciación de DNA.....	91
3.1.6. Equipos.....	91
3.1.7. <i>Software</i> informático.....	92
3.2. MÉTODOS.....	93
3.2.1. Programas de amplificación de DNA por PCR a tiempo final y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	93
3.2.2. Amplificación inicial de la población.....	94
3.2.3. Amplificación de DNA por PCR a tiempo final con enzima de alta fidelidad.....	94
3.2.4. Amplificación de DNA por PCR mutagénica a tiempo final.....	95
3.2.4.1. PCR mutagénica por desbalance en la concentración de nucleótidos.....	96
3.2.4.2. PCR mutagénica por aumento de la concentración de magnesio en la mezcla de reacción.....	97
3.2.4.3. PCR mutagénica por adición de manganeso a la mezcla de reacción.....	97
3.2.5. Amplificación de DNA por PCR asimétrica.....	97
3.2.6. Obtención de DNA de banda sencilla.....	98
3.2.7. Retrotranscripción de RNA a DNA.....	98
3.2.8. Transcripción <i>in vitro</i> de RNA.....	98
3.2.9. Electroforesis en geles de agarosa.....	98
3.2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas.....	99
3.2.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	99
3.2.12. Precipitación de ácidos nucleicos.....	99
3.2.12.1. Precipitación de DNA con acetato de sodio.....	99
3.2.12.2. Precipitación de RNA con acetato de amonio.....	100
3.2.13. Producción de la proteína diana Ebp1.....	100
3.2.14. Unión de la proteína diana Ebp1 al soporte para los procesos de selección o evolución <i>in vitro</i>	101
3.2.15. Selección y evolución <i>in vitro</i> de aptámeros de DNA y RNA específicos de Ebp1.....	102
3.2.16. Clonaje molecular de las poblaciones de aptámeros en <i>E. coli</i>	103
3.2.17. Secuenciación de DNA.....	104
3.2.18. Análisis y tratamiento de secuencias.....	104
3.2.19. Determinación de la afinidad entre los aptámeros de DNA o RNA y la proteína Ebp1 por <i>SELEX-like binding assay</i> (SELBA).....	105
3.2.20. Determinación de la afinidad entre los aptámeros de RNA y la proteína Ebp1 por SELBA de afinidad.....	106
3.2.21. Determinación de la afinidad entre los aptámeros y la proteína Ebp1 mediante <i>Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay</i> (ELONA).....	107
3.2.21.1. ELONA modificado acoplado a PCR o RT-PCR.....	107
3.2.21.2. ELONA acoplado a PCR cuantitativa (qPCR) o RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	108
3.2.22. Visualización de la estructura de ácidos nucleicos y complejos ácido nucleico-proteína mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	109
4. RESULTADOS.....	111
4.1. ANÁLISIS DE LA HETEROGENEIDAD DE LA POBLACIÓN INICIAL.....	113
4.2. DETERMINACIÓN DEL MÉTODO PARA INCREMENTAR LA TASA DE MUTACIÓN EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	115
4.2.1. PCR mutagénica por desbalance en la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción.....	116
4.2.1.1. Disminución de la concentración relativa de A y T respecto a G y C en la mezcla de reacción de la PCR.....	116
4.2.1.2. Aumento de la concentración relativa de A y T respecto a G y C en la mezcla de reacción de la PCR.....	117
4.2.2. PCR mutagénica por aumento de la concentración de magnesio en la mezcla de reacción.....	119
4.2.3. PCR mutagénica por adición del catión manganeso a la mezcla de reacción.....	120
4.3. SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE APTÁMEROS DE DNA ESPECÍFICOS DE EBP1.....	122

4.4. SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE APTÁMEROS DE RNA ESPECÍFICOS DE EBP1.....	124
4.5. EVOLUCIÓN <i>IN VITRO</i> DE APTÁMEROS DE DNA ESPECÍFICOS DE EBP1.....	125
4.6. EVOLUCIÓN <i>IN VITRO</i> DE APTÁMEROS DE RNA ESPECÍFICOS DE EBP1.....	127
4.7. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD POR EBP1 DE LOS APTÁMEROS DE DNA MEDIANTE <i>SELEX-LIKE BINDING ASSAY</i> (SELBA) “ESTÁNDAR”	130
4.8. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD POR EBP1 DE LOS APTÁMEROS DE RNA MEDIANTE <i>SELEX-LIKE BINDING ASSAY</i> (SELBA) “ESTÁNDAR”	131
4.9. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD POR EBP1 DE LOS APTÁMEROS DE RNA MEDIANTE <i>SELEX-LIKE BINDING ASSAY</i> (SELBA) DE AFINIDAD.....	133
4.10. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD APTÁMERO-EBP1 MEDIANTE <i>ENZYME-LINKED OLIGONUCLEOTIDE ASSAY</i> (ELONA) ACOPLADO A PCR O RT-PCR A TIEMPO FINAL...	136
4.11. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS APTÁMEROS DE DNA POR EBP1 MEDIANTE <i>ENZYME-LINKED OLIGONUCLEOTIDE ASSAY</i> (ELONA) ACOPLADO A PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QPCR). CARACTERIZACIÓN DE LOS APTÁMEROS DE DNA OBTENIDOS.....	138
4.11.1. Aplicación del ELONA acoplado a qPCR al análisis de las rondas de selección y evolución de DNA	140
4.11.2. Aplicación del ELONA acoplado a qPCR al análisis de aptámeros individuales de las últimas rondas de selección y evolución de DNA	142
4.11.3. Análisis de las secuencias y estructuras secundarias de los aptámeros de DNA obtenidos al final de los procesos DS y DE.....	143
4.11.4. Aplicación del ELONA acoplado a qPCR al cálculo de la constante de afinidad de los aptámeros seleccionados de las poblaciones DS08 y DE08	146
4.12. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS APTÁMEROS DE RNA POR EBP1 MEDIANTE <i>ENZYME-LINKED OLIGONUCLEOTIDE ASSAY</i> (ELONA) ACOPLADO A RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-QPCR). CARACTERIZACIÓN DE LOS APTÁMEROS DE RNA OBTENIDOS	148
4.12.1. Aplicación del ELONA acoplado a RT-qPCR al análisis de las rondas de selección y evolución de RNA	149
4.12.2. Aplicación del ELONA acoplado a RT-qPCR al análisis de aptámeros individuales de las últimas rondas de selección y evolución de RNA.....	151
4.12.3. Análisis de las secuencias y estructuras secundarias de los aptámeros de RNA obtenidos al final de los procesos RS y RE.....	152
4.12.4. Aplicación del ELONA acoplado a RT-qPCR al cálculo de la constante de afinidad de los aptámeros seleccionados de las poblaciones RS08 y RE08	155
4.13. VISUALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL IRES DE FMDV, LA PROTEÍNA EBP1 Y DE COMPLEJOS IRES-EBP1 MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).	157
4.13.1. Caracterización estructural del IRES de FMDV mediante AFM.....	157
4.13.2. Caracterización estructural de la proteína Ebp1 mediante AFM	159
4.13.3. Caracterización de la interacción entre el IRES de FMDV y la proteína Ebp1 mediante AFM.....	161
5. DISCUSIÓN.....	163
5.1. DETERMINACIÓN DEL MÉTODO PARA INCREMENTAR LA TASA DE MUTACIÓN EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	166
5.2. OBTENCIÓN DE APTÁMEROS DE DNA Y DE RNA ESPECÍFICOS DE EBP1 MEDIANTE SELECCIÓN Y EVOLUCIÓN <i>IN VITRO</i>	168
5.3. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD APTÁMEROS-PROTEÍNA MEDIANTE SELBA Y SELBA DE AFINIDAD.....	170
5.4. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD APTÁMEROS-PROTEÍNA MEDIANTE ELONA.	172

5.4.1. ELONA acoplado a PCR o RT-PCR a tiempo final	172
5.4.2. ELONA acoplado a PCR o RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR o RT-qPCR)	173
5.5. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS Y ESTRUCTURAS DE LOS APTÁMEROS OBTENIDOS	174
5.6. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE SELECCIÓN FRENTE A EVOLUCIÓN <i>IN VITRO</i>	177
5.7. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE DNA FRENTE A RNA	181
5.8. FUNCIONALIDAD DE LOS APTÁMEROS ANTI-EBP1 OBTENIDOS.....	182
5.9. VISUALIZACIÓN MEDIANTE AFM DE LA CONFORMACIÓN EN CONDICIONES NATIVAS DEL IRES DE FMDV, LA PROTEÍNA EBP1 Y COMPLEJOS IRES-EBP1	184
6. CONCLUSIONES.....	187
7. BIBLIOGRAFÍA.....	191
8. APÉNDICES.....	213
8.1. APÉNDICE I.....	215
8.2. APÉNDICE II	217
8.3. APÉNDICE III.....	267
8.4. APÉNDICE IV	389

ABREVIATURAS

AFM: microscopía de fuerza atómica
 ALISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a aptámeros (*Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay*)
 APS: persulfato de amonio
 APTES: 3-aminopropiltietoxisilano
 ARMD o DMAE: degeneración macular relacionada con la edad
 B_{max} : capacidad de unión máxima de un aptámero
 BSA: albúmina de suero bovino
 cDNA: DNA complementario
 Cf: concentración final
 Ct: ciclo umbral en el que comienza la amplificación exponencial en una qPCR (*threshold cycle*)
 C-terminal: extremo carboxilo terminal
 DE: proceso de evolución *in vitro* de aptámeros de DNA
 DEPC: dietilpirocarbonato
 DMF: N,N-Dimetilformamida
 DNA: ácido desoxirribonucleico
 DNasa: desoxirribonucleasa
 dNTP: desoxinucleótido trifosfato
 DTT: ditioneitol
 DS: proceso de selección *in vitro* de aptámeros de DNA
 dsDNA: DNA de doble cadena
 Ebp1: proteína número 1 de unión a ErbB3 (ErbB3 binding protein-1)
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
 ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
 ELONA: ensayo de oligonucleótidos ligado a enzimas (*Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay*)
 EMSA: ensayo de cambio de movilidad electroforética (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)
 FMDV: virus de la fiebre aftosa (*foot-and-mouth disease virus*)
 FRET: transmisión de energía de resonancia fluorescente (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)
 GNA: ácido nucleico derivado de glicerol (*Glycerol-derived Nucleic Acid*)
 His: histidina
 HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
 IRES: sitio interno de entrada del ribosoma
 ITAF: *IRES Trans-Acting Factor*
 IVT: transcripción *in vitro*
 K_d : constante de disociación
 LNA: ácido nucleico bloqueado (*Locked Nucleic Acid*)
 LUCA: último ancestro común universal (*Last Universal Common Ancestor*)
 mRNA: RNA mensajero
 Ni-NTA agarosa: resina sefarosa unida a Ni^{2+} - ácido nitriloacético (*Ni-NTA agarose*)
 nt: nucleótido
 N-terminal: extremo amino terminal
 NTP: nucleótido trifosfato
 pb: par de bases
 PBS: tampón fosfato salino
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo final

PEG: polietilenglicol
 PNA: ácido peptidonucleico (*Peptide Nucleic Acid*)
 PTB: proteína de unión al tracto de polipirimidina (Polypyrimidine Tract-Binding)
 p/v: peso/volumen
 qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
 R²: coeficiente de determinación
 RE: proceso de evolución *in vitro* de aptámeros de RNA
 RNA: ácido ribonucleico
 RNasa: ribonucleasa
 rNTP: ribonucleótido trifosfato
 r.p.m.: revoluciones por minuto
 rRNA: RNA ribosomal
 RS: proceso de selección *in vitro* de aptámeros de RNA
 RT: retrotranscripción
 RT-PCR: retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo final
 RT-qPCR: retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
 SDS: dodecilsulfato sódico
 SELBA: *SELEX-like binding assay*
 SELEX: evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*)
 ssDNA: DNA de cadena sencilla
 ssRNA: RNA de cadena sencilla
 SPR: resonancia de plasmón superficial
 TAE: tampón Tris-Ácido acético-Ácido etilendiaminotetraacético
 TBE: tampón Tris-Ácido bórico-Ácido etilendiaminotetraacético
 TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
 TNA: ácido nucleico de treosa (*Threose Nucleic Acid*)
 TS: tampón de selección
 u.a.: unidades arbitrarias
 UTR: región no traducida
 v/v: volumen/volumen
 VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
 VHC: virus de la hepatitis C
 VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN / SUMMARY

Resumen

El principal objetivo de esta Tesis ha sido el desarrollo y caracterización de aptámeros específicos frente a la proteína ErbB3-binding protein 1 (Ebp1). Los aptámeros, de DNA y RNA, se obtuvieron mediante selección *in vitro* y evolución *in vitro*. Las poblaciones finales de los cuatro procesos se analizaron y compararon para detectar y caracterizar los mejores aptámeros, así como para evaluar las estrategias utilizables para la obtención de los mismos.

Los aptámeros son moléculas de DNA de cadena sencilla o de RNA, seleccionadas a partir de poblaciones combinatoriales mediante un proceso conocido como SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*), que son capaces de unirse específicamente a un ligando determinado. En comparación con otras moléculas de unión (naturales o sintéticas) los aptámeros poseen propiedades químicas y bioquímicas únicas, entre las que destaca la posibilidad de ser seleccionados frente a cualquier tipo de diana, incluso en condiciones no fisiológicas. Desde la aparición de la tecnología SELEX, en 1990, se han obtenido numerosos aptámeros con alta especificidad y afinidad frente a un amplio rango de moléculas diana, entre ellas proteínas, ácidos nucleicos y complejos macromoleculares de gran relevancia en virología. En este trabajo se han desarrollado aptámeros frente a ErbB3-binding protein 1 (Ebp1), una proteína ITAF (*IRES-trans acting factor*) también conocida ITAF45 y PA2G4, que estimula la traducción de la poliproteína del virus de la fiebre aftosa (FMDV) mediante su unión al IRES viral.

Los principales objetivos de esta Tesis fueron: I) Obtener aptámeros de ssDNA y de RNA frente a la proteína Ebp1, comparando los procesos de selección *in vitro* de ambos ácidos nucleicos (DS, RS) con los de evolución *in vitro* (DE, RE), realizados en paralelo; II) Combinar la especificidad de los aptámeros por sus dianas con la sensibilidad de la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR a tiempo real para conseguir un método de detección ultrasensible basado en el ELONA-qPCR; III) Aplicar el sistema de ELONA-qPCR desarrollado a la caracterización funcional (incluyendo la cuantificación de la constante de disociación, K_d , y la capacidad de unión máxima, B_{max}) de los aptámeros obtenidos; IV) Identificar motivos cortos de secuencia/estructura presentes en los aptámeros de alta afinidad que podrían estar implicados en la interacción aptámero-Ebp1; y V) Realizar una caracterización preliminar de la estructura tridimensional del IRES de FMDV, de Ebp1 y de complejos IRES-Ebp1 mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).

Summary

This Thesis is aimed to the development and characterization of aptamers specific to the ErbB3-binding protein 1 (Ebp1). DNA and RNA aptamers have been developed by means of *in vitro* selection as well as by *in vitro* evolution. The final populations of the four processes were analyzed and compared in order to find the best aptamers, as well as to evaluate the strategies for aptamers development.

Aptamers are single-stranded DNA or RNA molecules selected from large combinatorial libraries through a process referred to as SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) that are able to specifically bind to a desired target molecule. As compared to other natural and synthetic binding molecules, aptamers possess unique chemical and biochemical features, including the ability to be selected against virtually any target, even in non-physiological conditions. Since the set up of SELEX technology in 1990, many aptamers have been developed with high specificity and affinity to a broad range of target molecules, some of them being proteins, nucleic acid regions and macromolecular assemblies highly relevant in virology. In this work, we have developed aptamers against the ErbB3-binding protein 1 (Ebp1), an IRES-trans acting factor also known as ITAF45 and PA2G4 that stimulates translation driven by the FMDV IRES.

The main objectives of this Thesis were the following: I) To obtain DNA and RNA aptamers against the protein Ebp1, comparing *in vitro* selection methods (DS, RS) with *in vitro* evolution processes (DE, RE) performed in parallel; II) To combine the specificity of the aptamers for their target molecules with the sensitivity of real-time nucleic acid amplification to set up an ultrasensitive detection method based on ELONA-qPCR; III) To apply the developed ELONA-qPCR system to the functional characterization (including the quantification of the dissociation constant, K_d , and maximum binding capacity, B_{max}) of the obtained aptamers; IV) To identify short sequence/structure motifs present in the high affinity aptamers that could be involved in the aptamer-Ebp1 interaction; V) Finally, to perform a preliminary analysis of the three-dimensional structure of FMDV IRES, Ebp1 and IRES-Ebp1 complexes by means of atomic force microscopy (AFM).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL ORIGEN Y LA EVOLUCIÓN TEMPRANA DE LA VIDA

Desde la antigüedad, los humanos hemos deseado conocer y comprender el origen del Universo, de la Tierra y, sobre todo, de la vida. Éstos han sido temas recurrentes de reflexión en las diferentes culturas y épocas: en los primeros tiempos mediante aproximaciones míticas o religiosas, más tarde a través de la filosofía y, posteriormente, utilizando el método científico. Como consecuencia, se han propuesto diferentes teorías sobre la aparición de la vida en nuestro planeta e incluso fuera de él. Las primeras reflexiones filosóficas acerca del origen de la vida hacían referencia a la generación espontánea y fueron expuestas por Platón, quien sostenía que tanto la materia vegetal como la animal, por sí solas, carecen de vida y solamente pueden adquirirla cuando el “alma inmortal” o la “psique” penetra en ellas. Del mismo modo, otro de los grandes filósofos de la Antigua Grecia, Aristóteles, consideraba que los seres vivos se formaban mediante la conjugación de la materia (principio pasivo que carece de vida) con la forma (siendo el alma el principio activo que da y mantiene la forma en la materia). Esta concepción acerca del origen espontáneo de la vida a partir de la materia que consideraban inanimada se mantuvo a lo largo de los siglos en la filosofía occidental, incluso tras realizarse los primeros estudios científicos como el llevado a cabo por Francesco Redi en 1668 (Redi 1668). En él, colocó carne en diferentes recipientes, cerrando unos y dejando otros abiertos. Redi comprobó que solamente en los abiertos se producía el crecimiento de larvas de moscas, lo que le llevó a la conclusión de que la generación espontánea no existía y que era el acceso de los insectos a los recipientes abiertos lo que permitía la posterior “aparición de vida” en ellos. La aceptación de que ningún ser vivo, ni siquiera los microorganismos, aparecía por generación espontánea, no se produjo hasta mediados del siglo XIX gracias a los experimentos de Louis Pasteur (Pasteur 1864). Su aproximación experimental consistió en hervir caldo nutritivo contenido en matraces de vidrio con cuello de cisne, observando que de esa forma se evitaba el crecimiento posterior de microorganismos en tales cultivos. Sin embargo, si rompía el cuello de alguno de los matraces sí se producía el crecimiento de microorganismos en su interior al cabo de unos días, con lo que parecía evidente que éstos habían entrado desde el exterior. Por tanto, los casos de supuesta generación espontánea debían explicarse como la “contaminación” de la materia orgánica inicial con microorganismos (o incluso polen o huevos de insectos) presentes en el aire.

Pocos años antes de la publicación de los resultados de Pasteur, Charles R. Darwin había sugerido en el último párrafo de su obra “El origen de las especies por medio de la selección natural” que todos los seres vivos actuales podrían derivar de un pequeño número de formas de vida o incluso de una sola (Darwin 1859). También Darwin, pero ya en 1871, en una carta enviada a

Joseph D. Hooker, hacía referencia al origen de la vida “en una pequeña charca de agua templada que contuviera todo tipo de sales de fósforo y amonio, luz, calor, electricidad, etc., en la cual un compuesto proteico se formara químicamente, quedando listo para sufrir cambios aún más complejos” (Darwin 1871). Por tanto, en la obra y la correspondencia del gran naturalista inglés encontramos el punto de partida de las dos aproximaciones que actualmente se utilizan en el campo del origen de la vida. La primera de ellas es la conocida como *top-down* o “de arriba hacia abajo”, que consiste en comparar las características de los organismos actuales asumiendo que aquéllas que estén presentes en un mayor número y diversidad de ellos serán más antiguas, hasta llegar a postular un conjunto de propiedades que deberían existir ya en los primeros seres vivos. La segunda aproximación, complementaria de la anterior, se conoce como *bottom-up* o “de abajo hacia arriba” y se basa en la realización de experimentos que permitan proponer posibles mecanismos para el origen de los primeros seres vivos.

La investigación sobre el origen de la vida recibió un impulso fundamental durante las primeras décadas del siglo XX gracias a los avances conceptuales realizados por Alexander I. Oparin y John B.S. Haldane de modo independiente (Oparin 1924, Haldane 1929). En sus obras se proponía que la vida pudo surgir mediante “síntesis prebiótica” a través de la interacción entre moléculas precursoras que, a su vez, procedían de reacciones químicas entre los componentes presentes en la Tierra primitiva. El modelo teórico de Oparin fue llevado a la práctica tres décadas después gracias a la aproximación experimental de Stanley L. Miller, trabajando en el laboratorio de Harold C. Urey (Miller 1953). En el conocido como “experimento de Miller”, este joven científico puso en contacto, en un sistema experimental formado por matraces de vidrio cerrados y en condiciones abióticas, los gases reducidos que en aquella época se pensaba (gracias al modelo de Oparin y al trabajo previo del propio Urey) que habían formado la atmósfera terrestre primitiva: amoníaco, hidrógeno, metano y vapor de agua. Tras aplicar descargas eléctricas a la mezcla de reacción durante varios días comprobó que los gases habían reaccionado entre sí formando un repertorio variado, pero limitado, de compuestos orgánicos. En diversas variantes de este mismo experimento, Miller consiguió obtener una mezcla de monómeros biológicos (incluyendo los aminoácidos que constituyen las proteínas) conocida como “sopa prebiótica”, una metáfora ya propuesta por Oparin. Con ello quedaba inaugurada una nueva disciplina científica que ejemplifica la aproximación *bottom-up* previamente comentada: la química prebiótica. En experimentos posteriores con una motivación similar, Joan Oró logró sintetizar adenina por condensación de ácido cianhídrico (Oró 1960). Tras los hallazgos de estos pioneros de la química prebiótica, otras líneas de investigación han ido demostrando la posibilidad de sintetizar abióticamente varios de los componentes monoméricos de las macromoléculas biológicas.

En la aproximación *top-down*, el principal hito producido durante las últimas décadas ha consistido en la demostración, gracias a la comparación de secuencias de RNA ribosomal, de que todos los seres vivos que forman la biodiversidad actual (divididos en los dominios Bacteria, Archaea y Eucarya) (Woese and Fox 1977) provienen de un antepasado común conocido como LUCA (de las siglas en inglés *Last Universal Common Ancestor*) (Woese and Fox 1977). La comparación de las rutas metabólicas y de los mecanismos implicados en el flujo de información genética también apoya fuertemente la existencia de LUCA. El ancestro común de toda la vida celular surgió en algún momento dentro del período comprendido entre hace 3900 millones de años (antigüedad de las primeras rocas sedimentarias, lo que indica la presencia de agua líquida en abundancia) (Chyba and Sagan 1992) y hace 3500 millones de años (edad de los primeros microfósiles de bacterias y de los estromatolitos más antiguos) (Schopf 1993). Dentro de ese marco temporal, por tanto, se debieron producir todos los procesos implicados en la transición desde los monómeros biológicos obtenidos mediante reacciones de química prebiótica hasta los primeros seres vivos capaces de evolucionar y diversificarse.

En el camino hacia la vida fue necesario que se originasen y combinaran tres componentes fundamentales de los seres vivos: i) un compartimento capaz de diferenciar el ser vivo de su entorno, probablemente una vesícula formada por moléculas anfífilas; ii) una maquinaria metabólica primitiva capaz de catalizar la transformación de las moléculas en el interior de la protocélula y además garantizar el flujo de materia y energía entre ella y su entorno; iii) una molécula con información genética capaz de replicarse y acumular mutaciones durante el proceso. La investigación de estas dos últimas características de los seres vivos ha generado aproximaciones hacia el origen de la vida con posturas antagónicas que propugnan, respectivamente, que el metabolismo fue anterior a la replicación (y, por tanto, las proteínas precedieron a los ácidos nucleicos), o bien que la replicación (y los ácidos nucleicos) apareció antes que un metabolismo basado en enzimas proteicas. Recientemente se han revisado y puesto en contexto los avances obtenidos en cada uno de los campos (Ruiz-Mirazo et al. 2014) proponiéndose la superación de estas aproximaciones reduccionistas y favoreciendo la idea de una química prebiótica en medios heterogéneos que permitieran la coevolución de los tres subsistemas fundamentales de los seres vivos (Figura I1). En cualquier caso, dentro de la corriente que otorga un papel fundamental a los ácidos nucleicos en el origen de la vida, destaca por su relevancia y versatilidad el modelo conocido como “Mundo RNA”.

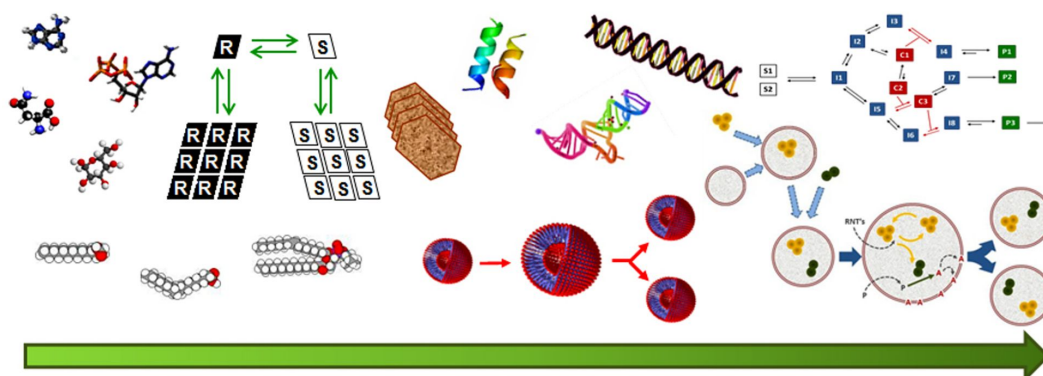


Figura 11. Representación esquemática de los procesos que debieron producirse coordinadamente para la formación de sistemas replicativos y metabólicamente viables [tomada de (Ruiz-Mirazo et al. 2014)].

1.2. EL MODELO DEL “MUNDO RNA”

La hipótesis del “Mundo RNA” se fundamenta en la capacidad de esta macromolécula tanto para almacenar información heredable (genotipo) como para realizar diferentes procesos bioquímicos (fenotipo), dado que en disolución genera un amplio repertorio de estructuras tridimensionales funcionales (Joyce 2002, Müller 2006, Ma 2010). La idea del origen de la vida basado en RNA fue propuesta por primera vez por Alexander Rich en 1962 (Rich 1962) y a finales de esa década se publicaron casi simultáneamente tres aproximaciones fundamentales hacia esta concepción por parte de Carl Woese (Woese 1967), Leslie Orgel (Orgel 1968) y Francis Crick (Crick 1968) [revisado en (Lazcano 2010)]. Dos décadas después, Walter Gilbert acuñó el término de “Mundo RNA” para referirse a un modelo según el cual, con anterioridad al mundo DNA-RNA-proteínas (el que permitió la aparición de LUCA), habría existido otra etapa evolutiva en la que el RNA sería la única macromolécula biológica (probablemente ayudada por ciertas moléculas orgánicas de pequeño tamaño) capaz de realizar todas las funciones necesarias para el mantenimiento de entidades protocelulares (Gilbert 1986) (Figura 12).

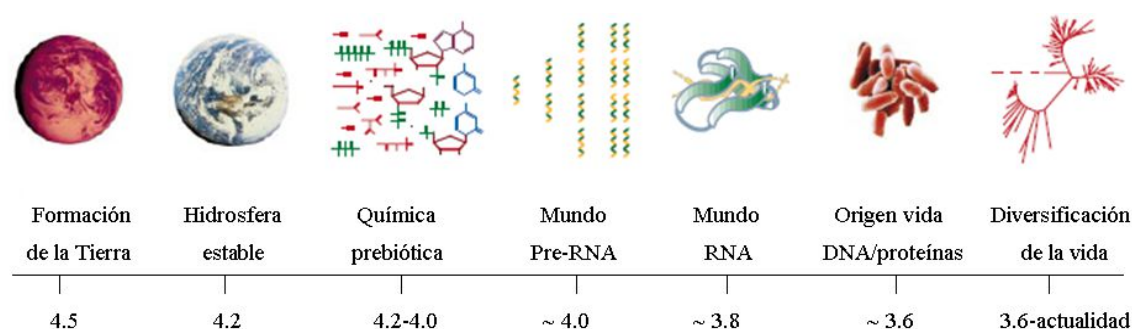


Figura I2. Esquema de la historia cronológica de la aparición de la vida sobre la Tierra. Se muestran las etapas hipotéticas a través de las cuales se originaron los primeros organismos celulares, con especial énfasis en el modelo del “Mundo RNA”. Las cifras indican miles de millones de años antes del presente. Figura adaptada de (Joyce 2002).

Un primer paso hacia la aceptación de esta hipótesis se produjo en 1970 gracias al descubrimiento de la actividad transcriptasa reversa o retrotranscriptasa por dos grupos independientes (Baltimore 1970, Temin and Mizutani 1970) que trabajaban con virus que posteriormente se denominarían “retrovirus”. La posibilidad de que la información genética se transmitiera en el sentido RNA \rightarrow DNA ponía en entredicho el hasta entonces llamado “dogma central de la biología molecular”, según el cual el flujo de la información era exclusivamente DNA \rightarrow RNA \rightarrow Proteínas, y que comenzó a formularse de la forma actualmente aceptada: DNA \leftrightarrow RNA \rightarrow Proteínas. Diez años después se produjo el empuje definitivo al modelo del Mundo RNA gracias al descubrimiento de los RNAs catalíticos, a los que Thomas Cech otorgó el nombre de “ribozimas” por similitud con las enzimas proteicas (Kruger et al. 1982). Las primeras capacidades catalíticas descubiertas en el RNA fueron el autoprocesamiento de intrones del grupo I de *Tetrahymena thermophila*, por el laboratorio del propio Cech, y la actividad endonucleasa de la molécula de RNA presente en la ribonucleasa P (RNasa P), por el grupo de Sidney Altman (Kruger et al. 1982, Cech 1983, Guerrier-Takada et al. 1983, Cech 1986, 1990).

Desde su descubrimiento hasta la actualidad se han caracterizado ocho tipos de ribozimas en la naturaleza, siete de los cuales catalizan la escisión o ligación de otras moléculas de RNA: grupos I y II de intrones autocatalíticos, RNasa P, ribozima *hammerhead* o “en cabeza de martillo”, ribozima *hairpin* o “en horquilla”, ribozima del virus de la hepatitis delta y ribozima VS (Doherty and Doudna 2000, Puerta-Fernandez et al. 2003, Lilley 2005). A diferencia de los demás, el octavo tipo, el centro peptidiltransferasa del ribosoma, es una región del RNA ribosomal 23/28S que cataliza la formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos previamente unidos a sus RNAs de transferencia específicos (Nissen et al. 2000, Beringer and Rodnina 2007). Adicionalmente,

gracias al desarrollo de las técnicas de selección y evolución molecular *in vitro* (de las que se hablará a continuación) se han conseguido ribozimas con nuevas o mejoradas capacidades catalíticas (Bartel and Szostak 1993, Johnston et al. 2001, Joyce 2009) así como moléculas de DNA catalítico que no existen en la naturaleza, conocidas como “DNAzimas” (Breaker 1997).

Otros apoyos adicionales al modelo del “Mundo RNA” provienen de las pruebas acumuladas sobre el papel del RNA en el metabolismo celular y en el flujo de información genética [revisado en (Joyce 2002, Müller 2006, Ruiz-Mirazo et al. 2014)], más allá de su protagonismo en la traducción proteica. Así, el RNA está involucrado en el procesamiento y edición del RNA mensajero y participa en el control de la expresión génica. En este último aspecto es destacable el papel de los *riboswitchs* o “ribo-interruptores”, descubiertos por Ronald Breaker y sus colaboradores en el año 2002: trabajando con la región 5' no traducida (5'-UTR) del mRNA de la proteína *btuB* de *E. coli* comprobaron que la unión directa (sin necesidad de proteínas) de la coenzima B12 a dicha región 5'-UTR producía un efecto regulador, reduciendo la expresión de dicho mRNA (Nahvi et al. 2002). Poco después, estos mismos investigadores observaron un efecto similar sobre la síntesis de tiamina (vitamina B1) en *E. coli*, al unirse con la propia molécula o con pirofosfato de tiamina el mRNA codificante para enzimas involucradas en la biosíntesis de esta vitamina (Winkler et al. 2002). Así, un *riboswitch* puede definirse como un elemento altamente estructurado que se encuentra normalmente en la región 5'-UTR de un mRNA, donde regula la expresión del gen correspondiente mediante su unión con pequeños metabolitos que actúan como moléculas efectoras. Por tanto, los *riboswitchs* pueden considerarse aptámeros (de los que se hablará posteriormente) naturales contenidos en un mRNA (Nahvi et al. 2002, Tucker and Breaker 2005).

A pesar de las evidencias a favor de que el RNA pudo haber funcionado como la primera macromolécula biológica en el mundo precelular, este modelo presenta varias limitaciones que están siendo investigadas en la actualidad. Entre ellas destacan el origen de los ribonucleótidos, sus posibles mecanismos de polimerización aleatoria con anterioridad a la existencia de actividades enzimáticas, la estabilidad de las moléculas de RNA formadas y la aparición de las primeras actividades ribozímicas en ellas [revisado en (Ruiz-Mirazo et al. 2014)]. En cuanto a la síntesis abiótica de ribonucleótidos, un problema que parecía tener difícil solución (Joyce 2002), es destacable el avance que recientemente se ha producido gracias a una aproximación basada en la química de sistemas (Powner et al. 2009, Patel et al. 2015). No obstante, dado que el origen y la abundancia prebiótica de la ribosa sigue siendo un tema abierto en el origen de la vida, existe un extenso campo de investigación sobre análogos de ácidos nucleicos en el que se han propuesto

diferentes polímeros informativos alternativos como protagonistas de eventuales “Mundos pre-RNA” que tal vez supusieron una interfase entre la química prebiótica y la evolución bioquímica (Joyce 2002, Robertson and Joyce 2012, Ruiz-Mirazo et al. 2014).

Los principales análogos de ácidos nucleicos sintetizados durante las últimas tres décadas mantienen su información genética en forma de secuencia de bases nitrogenadas, aunque éstas van unidas a un esqueleto de mayor estabilidad química que el basado en ribosa-fosfato del RNA y que podría haber tenido más probabilidad de ser sintetizado abióticamente. Uno de los primeros análogos desarrollados fue un ácido nucleico derivado de glicerol (*Glycerol-derived Nucleic Acid*, GNA), con un esqueleto compuesto por unidades de glicerol unidas por enlaces fosfodiéster (Schneider and Benner 1990). La búsqueda de simplicidad química llevó también a la síntesis del ácido nucleico basado en treosa (*Threose Nucleic Acid*, TNA), capaz de plegarse en estructuras tridimensionales funcionales (Schoning et al. 2000, Yu et al. 2012). Mediante una aproximación alternativa, en 1991 el grupo de Peter Nielsen sintetizó el análogo conocido como PNA (*Peptide Nucleic Acid*), que combina características de ácidos nucleicos y de proteínas: se obtiene por polimerización de unidades de N-(2-aminoetil)glicina a las cuales están unidas las bases nucleotídicas mediante enlaces metilencarbonilo (Nielsen et al. 1991, Crowe and Sutherland 2006). Entre los demás ácidos nucleicos sintéticos descritos hasta la fecha, merecen especial mención los análogos que contienen motivos restringidos conformacionalmente, como el LNA (*Locked Nucleic Acid*), un polímero de 2'-O-4'-C-metileno unido a monómeros de β -D-ribonucleótido (Obika et al. 1997, Briones and Moreno 2012). Todos estos análogos son capaces de hibridar con hebras de RNA y de DNA de cadena sencilla (ssDNA), por lo que si alguno de ellos (u otros similares) protagonizó un eventual “Mundo pre-RNA” podría haber actuado como molde para transmitir al RNA la información genética acumulada hasta ese momento. Además, varios de estos ácidos nucleicos artificiales pueden realizar actividades catalíticas *in vitro* (Taylor et al. 2015).

La polimerización de monómeros de RNA (en ocasiones, utilizando ribonucleótidos activados químicamente) se ha estudiado en sistemas experimentales dependientes e independientes de molde que utilizan la capacidad catalítica y estabilizadora proporcionada por la montmorillonita y otros sustratos minerales (Ferris 2006), las interfases entre medios acuosos y lipídicos (Olasagasti et al. 2011) o las soluciones eutécticas con presencia de agua y de hielo (Monnard et al. 2003). En lo referente al origen de las primeras capacidades catalíticas del RNA, tradicionalmente se había mantenido que de la síntesis aleatoria de oligorribonucleótidos podrían surgir *de novo* RNAs catalíticos capaces de funcionar incluso como RNA polimerasas (Joyce 2002). Sin embargo, otros autores han propuesto que sería mucho más probable un origen *paso a paso* de moléculas de RNA

funcionales por medio de un mecanismo denominado “evolución modular” (Briones et al. 2009). Según este modelo, módulos cortos (menores de 40 nucleótidos, nt) de RNA estructurado y con ciertas funcionalidades bioquímicas se irían ligando progresivamente gracias a que algunos de ellos [presentes en proporción suficientemente alta en poblaciones de secuencia aleatoria (Manrubia and Briones 2007)] podrían actuar como ribozimas *hairpin* capaces de ligar otros módulos preformados. En cualquier caso, el establecimiento de un “Mundo RNA” debió requerir la aparición de ribozimas suficientemente complejas y con actividad RNA polimerasa dependiente de molde, que (por sí mismas o gracias a la colaboración con cofactores peptídicos o de otro tipo) garantizaran la continuidad evolutiva de la información genética de un “protogenoma” de RNA que se iba construyendo y sometiendo a selección (Ruiz-Mirazo et al. 2014).

A pesar de que hasta el momento no se ha descubierto en la naturaleza ninguna RNA polimerasa RNA-dependiente (también llamada “RNA replicasa”) capaz de replicar por completo otra molécula molde con la misma secuencia que el catalizador, diferentes líneas experimentales han logrado obtener ribozimas con actividad RNA polimerasa mediante evolución *in vitro* a partir de RNA ligasas. En ellas, el aumento progresivo en su capacidad replicativa ha sido paralelo a una reducción en el número de mutaciones introducidas durante el proceso. Así, mientras que la polimerización de RNA dependiente de molde en interfases acuosas-lipídicas muestra una tasa de mutación de $9,9 \times 10^{-2}$ errores por nucleótido copiado (Olasagasti et al. 2011), la tasa de mutación de la ribozima RNA polimerasa conocida como “R18” es de $1,1 \times 10^{-2}$ errores/nt (Johnston et al. 2001), y la de la ribozima tC19Z (derivada de la anterior) disminuye hasta $8,8 \times 10^{-3}$ errores/nt (Wochner et al. 2011). Estos datos sugieren que sea cual fuere la tasa de mutación de las RNAs polimerasas primitivas que pudieron iniciar el mundo RNA, su valor sería suficientemente alto (y, en cualquier caso, mucho mayor que la tasa de mutación de 10^{-9} errores/nt típica de las células y los virus con genoma de DNA actuales) como para explorar muy eficientemente el espacio de secuencias, proporcionando así un variado repertorio de genotipos. La investigación sobre sistemas replicativos con tasas de mutación intermedias entre ambos extremos se lleva a cabo, desde finales de la década de 1970 (Domingo et al. 1978), empleando virus RNA y viroides, que replican produciendo aproximadamente de 10^{-3} a 10^{-4} errores/nt por cada ronda de replicación y que originan poblaciones complejas denominadas “cuasiespecies víricas” (Domingo and Holland 1997, Gago et al. 2009). De hecho, Manfred Eigen sugirió, cuando expuso el modelo de cuasiespecies (Eigen 1971), que este tipo de estructura poblacional podría haber sido beneficioso para los replicones primordiales en el mundo precelular, ya que al actuar la población completa como unidad de selección se permitiría mantener dentro del espectro de mutantes genotipos que de otra forma podrían haber sido eliminados por deriva aleatoria.

1.3. SELECCIÓN Y EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS *IN VITRO*

La primera teoría sobre la evolución biológica fue propuesta a principios del siglo XIX por Jean-Baptiste de Monet, caballero de Lamarck, en su obra “Filosofía zoológica” (Lamarck 1809). En ella afirmaba que los seres vivos que habitan en un determinado ambiente han de adaptarse a las nuevas circunstancias que pueden aparecer en él. En respuesta a éstas se desarrollan o atrofian órganos ya existentes, o bien aparecen otros nuevos: es decir, “la función crea el órgano y la necesidad la función”. Aunque el “lamarckismo” es una explicación errónea de la evolución por considerarla como un proceso finalista, esta teoría aportó una explicación muy valiosa para entender el concepto de herencia: las variaciones producidas en los seres vivos que los hacen más aptos en un ambiente dado se mantienen en su descendencia. Posteriormente, en “El origen de las especies por medio de la selección natural” (Darwin 1859), Charles R. Darwin mantuvo algunos de los conceptos propuestos por Lamarck pero, a diferencia de él, no consideró el cambio evolutivo como el resultado de una *necesidad*, sino como una consecuencia de la selección natural a partir de una diversidad generada por *azar*. El concepto de evolución por selección natural fue sugerido casi simultáneamente, aunque con menor profundidad conceptual, por otro gran científico contemporáneo de Darwin: Alfred R. Wallace. Según el planteamiento de Wallace y Darwin, durante la reproducción de los seres vivos se producirían de forma natural variaciones que, en función de la capacidad de adaptación que otorgasen al individuo en ese ambiente y momento concretos, permitirían o no su supervivencia y, en cualquier caso, afectarían a su capacidad reproductiva o *fitness*. Como consecuencia, se produciría una *selección* de aquellos individuos más adaptados limitándose al mismo tiempo el tamaño poblacional de las especies que, de no ser así, tenderían a crecer exponencialmente.

La evolución por selección natural fue ampliamente demostrada por la evidencia experimental acumulada en los campos de la paleontología, la zoología, la botánica y, más adelante, también por la genética. De hecho, en las primeras décadas del pasado siglo se produjo una fructífera síntesis entre las ideas del darwinismo, la teoría genética de Gregor Mendel como base de la herencia y la genética de poblaciones. Los principales artífices de la denominada “Teoría sintética” fueron John B.S. Haldane, Ronald Fisher y Sewall G. Wright (Huxley 1942). Posteriormente, ya en la era de la biología molecular, las mutaciones puntuales se propusieron como los mecanismos más evidentes mediante los cuales se introduce diversidad biológica durante la replicación del material genético, el genotipo, que al expresarse se traduce en una diversidad de fenotipos sobre los que actuará la selección natural. Durante el último medio siglo se han sucedido importantes avances en el estudio de los mecanismos evolutivos. Sin entrar en detalles, merece la

pena destacar el reconocimiento de que parte de las mutaciones introducidas en un genoma no tienen efecto fenotípico aparente sino que se manifiestan como *neutrales*, permitiendo así que la deriva génica actúe como una fuerza evolutiva adicional a la selección natural (Kimura 1985). Además, se han descubierto y caracterizado mecanismos evolutivos que no se basan en una diversidad generada por mutaciones, inserciones o deleciones puntuales, sino en procesos como la recombinación genética, las inversiones génicas, la transposición de fragmentos del genoma o la transferencia génica horizontal (en muchas ocasiones, mediada por virus) de secuencias de DNA provenientes de otras especies (Barton et al. 2007). En cualquier caso, la dualidad entre generación de diversidad en el genotipo y selección sobre los fenotipos resultantes es una de las características fundamentales y definitorias de los seres vivos.

En cuanto al trabajo experimental para estudiar los procesos evolutivos a nivel molecular, en 1967 Sol Spiegelman y sus colaboradores realizaron el primer experimento de evolución *in vitro* en un sistema libre de células (Mills et al. 1967). En él observaron que durante el proceso de replicación *in vitro* del bacteriófago Q β (un virus con genoma de RNA que infecta células de *E. coli*) mediante la técnica de transferencias en serie, la tasa de replicación del genoma viral por parte de la proteína RNA polimerasa del propio virus aumentaba en varios órdenes de magnitud. Esto se debía a que el RNA genómico del fago se acortaba por eliminación de las secuencias innecesarias para la replicación en dicho sistema *in vitro*. Las secuencias no sometidas a presión selectiva y, por tanto, prescindibles en este contexto experimental, acabaron suponiendo todo el genoma excepto la región requerida para su reconocimiento por parte de la RNA polimerasa. De este modo, la población final quedaba compuesta mayoritariamente por moléculas de RNA de tamaño mucho menor (218 nucleótidos frente a los 4220 iniciales) que eran replicadas a velocidad mucho mayor que los genomas virales completos. Con ello se demostraba que los mecanismos evolutivos no afectan únicamente a los organismos (pluricelulares o unicelulares) y a los virus, sino que también rigen el comportamiento de conjuntos de moléculas de ácidos nucleicos sometidas a procesos de selección y amplificación *in vitro*. De esta forma quedaba inaugurada la disciplina científica denominada “evolución experimental *in vitro*” o “evolución molecular” en la que se enclava el trabajo realizado en esta Tesis.

La puesta a punto de la tecnología actual de selección de ácidos nucleicos *in vitro* se llevó a cabo en 1990 por dos laboratorios de forma independiente (Ellington and Szostak 1990, Tuerk and Gold 1990). Por una parte, Tuerk y Gold desarrollaron un procedimiento cíclico que alternaba la selección de moléculas de RNA con afinidad por una proteína (en concreto, la DNA polimerasa del fago T4) con la amplificación de las moléculas de RNA unidas a su diana. Con ello conseguían, al

realizar un número creciente de rondas, un enriquecimiento exponencial de RNAs con capacidad de unión específica a la polimerasa. Como consecuencia, denominaron al proceso “*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*”, siendo más conocido por sus siglas: SELEX. Por su parte, Ellington y Szostak realizaron la selección de moléculas de RNA capaces de unirse de modo específico a diferentes colorantes orgánicos a partir de una población compuesta (al igual que en el caso de Tuerk y Gold) por oligómeros de RNA con secuencia aleatoria. Del mismo modo, realizaron ciclos de selección y amplificación de las moléculas unidas y analizaron mediante clonaje molecular las secuencias individuales de RNA obtenidas en la población final. Como consecuencia de la afinidad de tales moléculas por el ligando en cuestión, estos investigadores decidieron otorgarles el nombre de “aptámeros”, derivado de la palabra latina *aptus*, que significa “encajar”, junto con el término griego *meros*, que significa “unidad” o “partícula”.

Por su parte, los primeros aptámeros de DNA se seleccionaron en el año 1992 contra diferentes marcadores orgánicos como el reactivo *Brown* (Ellington and Szostak 1992), siguiendo el ejemplo de las selecciones realizadas con RNA dos años antes (Ellington and Szostak 1990). Con ello se demostraba que el DNA de cadena sencilla poseía similar capacidad de unión selectiva y específica a sus ligandos que el RNA.

En paralelo, se han obtenido también aptámeros de naturaleza peptídica mediante sistemas de alto rendimiento que permitieron identificar los miembros de una población combinatorial (generalmente unidos por ambos extremos a un armazón proteico común a todos ellos) capaces de interaccionar con un ligando determinado (Colas et al. 1996). Posteriormente, el método denominado “mRNA display” ha permitido la selección *in vitro* de péptidos y proteínas con diferentes capacidades de unión (Roberts and Szostak 1997). En cualquier caso, los aptámeros de naturaleza peptídica quedan fuera de los objetivos de esta Tesis, centrada en el desarrollo de aptámeros de RNA y DNA.

Una aproximación complementaria a la realizada por los grupos de Gold y de Szostak fue la llevada a cabo por el de Gerald F. Joyce, que realizó una evolución *in vitro* a partir de la secuencia del intrón autocatalítico del grupo I de *Tetrahymena* (que, como se indicó anteriormente, había sido la primera ribozima descubierta una década antes) mediante ciclos de amplificación con mutación y selección (Robertson and Joyce 1990). Gracias a ello se obtuvieron diferentes variantes funcionales de la secuencia original, una de las cuales consiguió mejorar la eficiencia de la ribozima natural. Con estos experimentos se sentaban las bases para distinguir entre procesos de selección y de evolución *in vitro*, principalmente, como se indicará posteriormente, en función de la tasa de mutación introducida durante el proceso de amplificación.

encuentran (temperatura, pH, fuerza iónica y concentración de cationes divalentes). En la interacción aptámero-ligando influyen las fuerzas electrostáticas de atracción o repulsión entre grupos cargados, interacciones de Van der Waals entre grupos neutros, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Patel 1997, Patel et al. 1997, Hermann and Patel 2000, Djordjevic 2007). Así, el plegamiento en estructuras tridimensionales definidas permite a los aptámeros interaccionar con ligandos de bajo peso molecular al generar un dominio de unión específico para ellas, o bien unirse a regiones o subestructuras concretas (o epítomos) de la superficie molecular en el caso de dianas de mayor tamaño como proteínas o agregados macromoleculares. En cualquier caso, cuando interaccionan con su diana los aptámeros pueden sufrir cambios conformacionales de distinto tipo (Stoltenburg et al. 2007). En la Figura I4 se muestra un esquema sencillo del plegamiento de los aptámeros y su unión con un ligando.

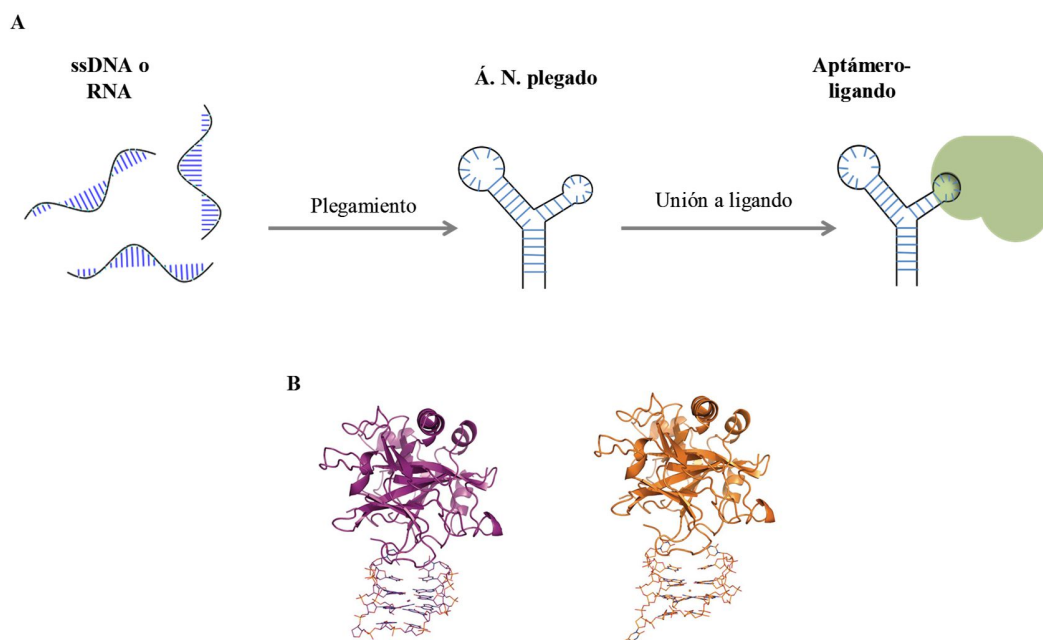


Figura I4. A) Representación esquemática del plegamiento de un aptámero y su unión con un ligando por el que posee afinidad. Los oligonucleótidos de ssRNA o ssDNA se pliegan en función de su secuencia y de las condiciones físico-químicas del entorno en que se encuentran, y la estructura resultante permite la unión entre aptámero y ligando. Modificada de (Stoltenburg et al. 2007). B) Interacción de la proteína trombina (representada con su estructura secundaria) y su aptámero (representado utilizando un modelo de barras y esferas) en diferentes condiciones. La imagen de la izquierda, en morado, representa la estructura del complejo en presencia de sodio. La imagen derecha, en marrón claro, muestra la formación del complejo en presencia de potasio, observándose una modificación en la estructura adoptada por el aptámero anti-trombina (Russo Krauss et al. 2012).

1.4.2. Los aptámeros como herramientas biotecnológicas: comparación con los anticuerpos

Los aptámeros poseen propiedades similares a los anticuerpos en cuanto a su interacción con sus ligandos específicos, pero existen diferencias fundamentales entre unos y otros que se resumen en la Tabla II.

Tabla II. Comparación de las características de los anticuerpos con las de los aptámeros.

Anticuerpos	Aptámeros
Producción en cultivos celulares y en animales de experimentación	Selección <i>in vitro</i>
Variación entre lotes debido a la variabilidad biológica del hospedador	Síntesis química controlada, sin variación entre lotes de producción
Funcionan únicamente en condiciones fisiológicas	Trabajo en cualquier condición fisico-química compatible con la estabilidad de los ácidos nucleicos
Limitados a dianas que pueden producir una respuesta inmune y que no son tóxicas para el cultivo o animal	Todo tipo de dianas (incluyendo las tóxicas o no inmunogénicas)
Su modificación química puede producir pérdida de función	Variedad de modificaciones químicas, de fácil introducción gracias a la química de ácidos nucleicos
Sensibles a cambios de las condiciones en el ambiente	Mayor estabilidad, sobre todo en el caso del DNA y del RNA modificado químicamente
Su desnaturalización es irreversible	Pueden desnaturalizarse y renaturalizarse de forma reversible (por tanto, no requieren seguir la cadena de frío para su conservación)
Pueden desencadenar respuesta inmune	No inmunogénicos

Las ventajas de los aptámeros sobre los anticuerpos han hecho que, a pesar de que su desarrollo se inició varias décadas después que el de los anticuerpos, estén utilizándose crecientemente desde mediados de la década de 1990. Los principales factores que han impulsado el uso de los aptámeros en aplicaciones biotecnológicas y biomédicas son los siguientes (Yang et al. 2007, Mairal et al. 2008, Mok and Li 2008, Mehta et al. 2011, Song et al. 2012):

- Producción: El proceso *in vitro* por el que son seleccionados los aptámeros no requiere el uso de cultivos celulares ni animales de experimentación. Esto permite un mayor control sobre las variables físico-químicas en la unión de los aptámeros a sus dianas, pudiendo emplearse condiciones no fisiológicas de temperatura, pH y fuerza iónica (McKeague and Derosa 2012). Como consecuencia de su producción *in vitro*, una vez seleccionados, los aptámeros pueden ser

obtenidos en gran cantidad mediante síntesis química con alta precisión, reproducibilidad y pureza, pudiendo además ser modificados químicamente a voluntad. Adicionalmente, al no utilizarse animales de experimentación se evita la variabilidad entre lotes típica en la obtención de anticuerpos. Con todo ello, la producción de aptámeros es más rápida, permite un amplio rango de condiciones de trabajo y reduce el uso de animales con fines de experimentación, todo lo cual redunda en un menor coste económico.

- Fácil modificación química: Aprovechando el extenso conocimiento sobre química de ácidos nucleicos, los aptámeros pueden ser modificados fácilmente para lograr distintos objetivos, entre los que se encuentran los relacionados con el aumento de su estabilidad química (ver subapartado 1.4.9) y su aplicación directa en diagnóstico y terapia (Lakhin et al. 2013).

- Alta estabilidad: Los aptámeros de DNA (y los de RNA modificados químicamente) son estables a largo plazo y pueden ser transportados a temperatura ambiente y/o en desecación. Esto se debe a que, a diferencia de las proteínas, los oligonucleótidos poseen mayor estabilidad térmica y su desnaturalización es reversible, por lo que mantienen sus estructuras funcionales aunque sufran ciclos repetidos de desnaturalización/renaturalización.

- Baja inmunogenicidad: Los ácidos nucleicos normalmente no son reconocidos por el sistema inmune como agentes extraños y, por lo tanto, no desencadenan una respuesta inmune cuando son utilizados *in vivo* como agentes terapéuticos.

- Variedad de dianas: Es posible seleccionar aptámeros con una alta afinidad y especificidad para algunos ligandos que no pueden ser reconocidos por anticuerpos, tales como iones o moléculas pequeñas, así como compuestos tóxicos o poco inmunogénicos (Song et al. 2012). Además, debido a su bajo peso molecular (7–30 kDa para aptámeros *versus* ~150 kDa para anticuerpos), pueden unirse a regiones de pequeño tamaño de una diana que resulten inaccesibles para los anticuerpos (Binning et al. 2012).

1.4.3. Aptámeros de DNA *versus* aptámeros de RNA

Como se ha indicado anteriormente, los procesos de selección/evolución *in vitro* permiten la obtención de aptámeros tanto de (ss)RNA como de ssDNA. La utilización de uno u otro tipo de ácido nucleico no produce una mejoría en cuanto a la afinidad y especificidad de los aptámeros obtenidos en términos generales, habiéndose comprobado que la selección de aptámeros de ssDNA y RNA para un mismo ligando puede dar lugar a aptámeros igualmente funcionales pero que se unen a diferentes epítomos de la diana en cuestión (Bock et al. 1992, Kubik et al. 1994, Kulbachinskiy 2007, Jeong et al. 2010, Savory et al. 2010). Además, algunos estudios muestran el

funcionamiento de aptámeros homólogos de DNA y RNA frente a una misma molécula diana (Walsh and DeRosa 2009).

En general, los aptámeros de RNA presentan una mayor plasticidad estructural (y funcional) que los de ssDNA debido a que pueden establecer distintos tipos de apareamientos entre las nucleobases, incluyendo los estándar o “de Watson-Crick” y otros no estándar (en particular el “*wobble* G-U”), lo que les permite dar lugar a una gran diversidad de motivos estructurales (Leontis et al. 2006). Asimismo, diferentes estudios experimentales y teóricos realizados sobre el RNA mostraron que este ácido nucleico puede formar una gran variedad de estructuras secundarias y terciarias gracias a la presencia del grupo 2'-hidroxilo en la ribosa, que puede actuar como donador o como aceptor de electrones en enlaces por puentes de hidrógeno (Spirin 2002).

Por el contrario, los aptámeros de DNA pueden adoptar un repertorio más limitado de conformaciones y son (debido a la ausencia del grupo hidroxilo en posición 2' de la desoxirribosa) menos reactivos que los de RNA. Además, a diferencia de los de RNA, no pueden expresarse en el interior celular, lo que limita su uso como agentes terapéuticos (Mayer et al. 2001). Sin embargo, los aptámeros de DNA muestran algunas ventajas interesantes: son más estables en un mayor rango de condiciones físico-químicas (como en medio alcalino o a temperatura ambiente), resultan más difíciles de degradar por nucleasas y permiten una síntesis química a gran escala más barata que en el caso de los de RNA (Zhou and Rossi 2014).

El procedimiento de obtención de aptámeros de RNA y DNA presenta varias diferencias, como se muestra en las Figuras I5 e I6.

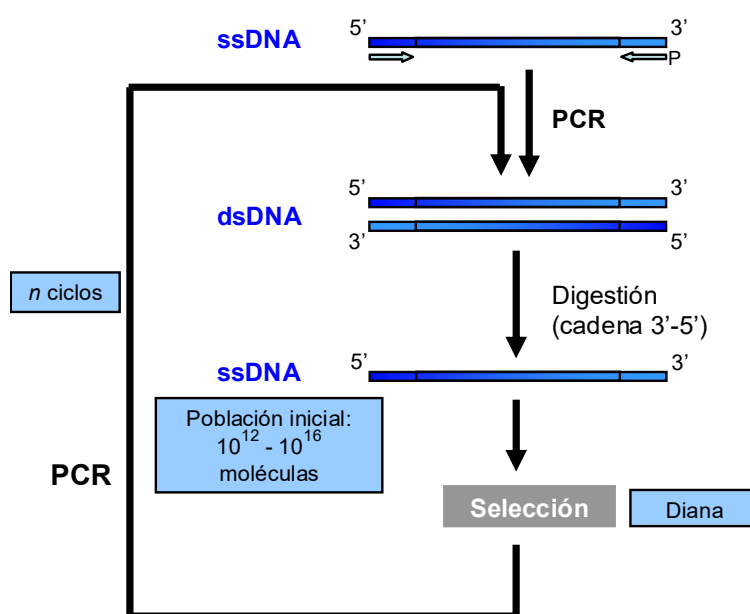


Figura I5. Esquema básico de un sistema de selección *in vitro* de aptámeros de DNA. El proceso comienza con una población combinatorial inicial de ssDNA que es amplificada a dsDNA. El dsDNA se digiere a ssDNA (o bien la cadena sencilla se selecciona mediante algún sistema bioquímico alternativo, como se indica en el texto) para su utilización en la etapa de selección, durante la cual la población es incubada con la diana en las condiciones físico-químicas deseadas. Tras ello, las moléculas de ssDNA no unidas se separan para que únicamente aquellas cuya estructura les otorga afinidad por la diana puedan ser eluidas y amplificadas mediante PCR, dando lugar (tras la correspondiente digestión enzimática) a la nueva población de ssDNA que comenzará un nuevo ciclo de selección-amplificación. El proceso se realiza el número n de ciclos necesario para alcanzar la afinidad aptámero-diana deseada.

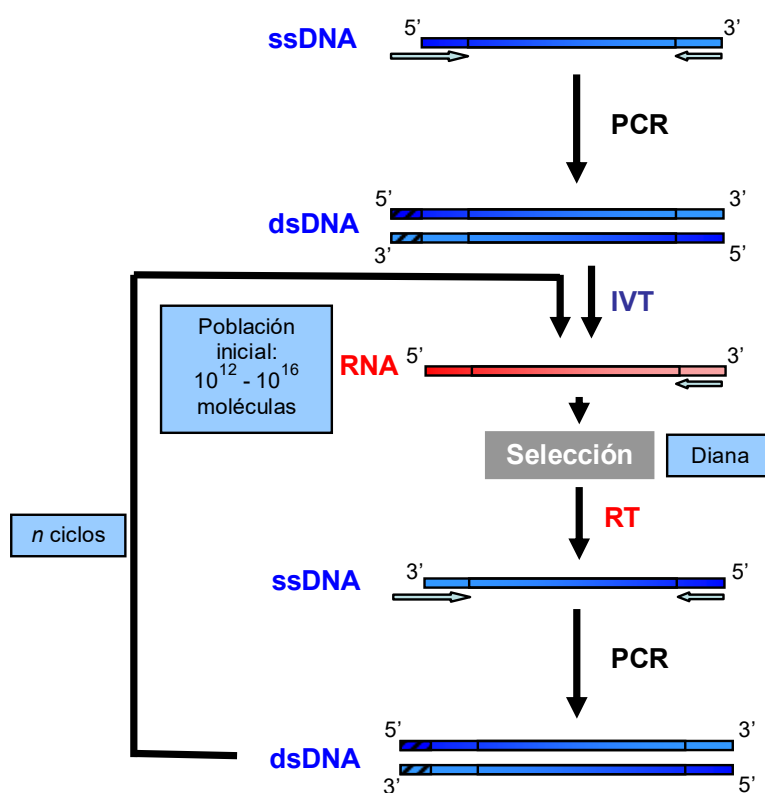


Figura I6. Esquema básico de un sistema de selección *in vitro* de aptámeros de RNA. El proceso comienza con una población combinatorial inicial de ssDNA que es amplificada a dsDNA, fase en el que uno de los cebadores incluye la secuencia promotora de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (que origina la secuencia rayada que aparece en el esquema). El dsDNA se transcribe a RNA para su utilización en la etapa de selección, durante la cual la población es incubada con la diana en las condiciones físico-químicas deseadas. Tras ello, las moléculas de RNA no unidas se separan para que únicamente aquellas cuya estructura les otorga afinidad por la diana puedan ser eluidas, retrotranscritas, amplificadas mediante PCR y transcritas a RNA dando lugar a la nueva población de RNA que comenzará un nuevo ciclo de selección-amplificación. El proceso se realiza el número n de ciclos necesario para alcanzar la afinidad aptámero-diana deseada.

Tanto en la selección de aptámeros de DNA como de RNA, la población combinatorial inicial está compuesta por moléculas de ssDNA. Como consecuencia, durante el proceso de selección de aptámeros de RNA, la población de DNA debe ser primero transcrita a RNA utilizando una RNA polimerasa DNA-dependiente bacteriana o viral (Mok and Li 2008). El método más extendido consiste en la inclusión en el DNA (mediante su adición a uno de los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR) de la secuencia promotora de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, que permite la transcripción *in vitro* (IVT) de DNA a RNA en presencia del DNA molde y ribonucleótidos trifosfato (rNTPs) (Stoltenburg et al. 2007).

Por su parte, y como se vio en la Figura I5, en el caso de la selección de moléculas de DNA lo habitual es realizar una amplificación mediante PCR de la población combinatorial inicial. Con ello se eliminan los productos de síntesis de DNA abortivos o dañados, ya que no pueden ser amplificados por PCR (Marshall and Ellington 2000), y se obtiene un mayor número de copias de las moléculas originales en la población de partida (Stoltenburg et al. 2007). Tras la PCR es recomendable obtener DNA de cadena sencilla (ssDNA, con el que se realizará el proceso de selección), para lo que hay varios métodos descritos en la bibliografía [revisado en (Kulbachinskiy 2007, Marimuthu et al. 2012, Svobodova et al. 2012)]:

(i) Introducción de un grupo químico (generalmente biotina o polietilenglicol, PEG) en la posición 5' de uno de los cebadores usados en la amplificación por PCR. Gracias a ello, las cadenas de DNA pueden ser separadas en condiciones desnaturalizantes, bien en una columna con estreptavidina de manera que la cadena de ssDNA biotinilada se una a la columna mientras que la no marcada queda libre, bien por tamaño mediante electroforesis si se ha marcado con PEG (Williams and Bartel 1995, Murphy et al. 2003).

(ii) Realización de una PCR asimétrica con un exceso de uno de los cebadores, lo que permite amplificar de modo preferente una cadena de DNA respecto de la otra (Ellington and Szostak 1992).

(iii) Introducción de grupos fosfato en el extremo 5' de uno de los cebadores (el correspondiente a la hebra no deseada) de la PCR, teniendo en cuenta que la síntesis química de oligonucleótidos genera extremos 5'-OH (hidroxilo). A continuación el dsDNA obtenido es tratado con nucleasas que degradan única o preferentemente la hebra fosforilada en 5'. Se ha demostrado que la generación de ssDNA utilizando exonucleasa *lambda* es más eficiente que otras técnicas y produce ssDNA con un alto grado de pureza y gran rendimiento (Avci-Adali et al. 2009).

1.4.4. Características de la población inicial

La generación de una población combinatorial, como la de cualquier otro oligonucleótido de DNA, se realiza mediante síntesis automatizada en sentido 3'-5', sobre una fase sólida de sílica inerte, utilizando soluciones de las cuatro fosforamiditas de nucleósido (Beaucage and Iyer 1992). Para obtener secuencias con la región central aleatorizada como las mostradas en la Figura I3, se trabaja de forma diferente en las regiones constantes (donde se introduce en cada posición la fosforamidita correspondiente) y en la región central (en cada una de cuyas posiciones se introduce una mezcla con las cuatro fosforamiditas, de forma que se incorporará aleatoriamente una u otra en cada molécula) (Mok and Li 2008).

El número teórico de moléculas diferentes que podrían sintetizarse en la población combinatorial es de 4^n , siendo n el número de posiciones de la región aleatoria. Por ejemplo, en el caso de que dicha región aleatoria tuviese 40 nt de longitud, el número total de combinaciones posibles sería de 4^{40} , es decir, $1,21 \times 10^{24}$ moléculas. La masa teórica del DNA resultante de la síntesis de al menos una copia de todas las moléculas posibles de esta población sería de aproximadamente unos 25 kg, una cantidad que evidentemente es inmanejable en la práctica. En su lugar, como se comentó anteriormente, las poblaciones iniciales utilizadas en los experimentos de selección *in vitro* habituales constan de entre 10^{11} y 10^{16} moléculas de DNA.

A pesar de que tal repertorio de secuencias corresponde a una fracción ínfima (entre 10^{-8} y 10^{-13}) del número teórico correspondiente a una región aleatoria de 40 nt, resultan suficientes para iniciar el proceso si se tiene en cuenta que la selección se va a producir por el fenotipo (en este caso, la estructura del ácido nucleico) y no por el genotipo (su secuencia). Esto se debe a que la relación entre las secuencias y estructuras de los ácidos nucleicos de banda sencilla se puede resumir en cuatro principios básicos (Schuster 1997a, Schuster 1997b, Joyce 2004, Stich et al. 2008, Aguirre et al. 2011): (1) el número de secuencias posibles es mucho mayor que el de las estructuras estables en las que éstas se pliegan, ya que muchas secuencias forman la misma estructura (lo que se expresa diciendo que el espacio de secuencias y estructuras está “degenerado”), tal como se ejemplifica en la Figura I7; (2) para una longitud de secuencia dada, las llamadas “estructuras comunes” (como motivos tallo-lazo u horquilla) aparecen más frecuentemente (varios órdenes de magnitud) que las estructuras raras (motivos más complejos estructuralmente); (3) para encontrar una secuencia que pliega en alguna de las estructuras comunes no se necesita explorar todo el espacio de secuencias; y (4) las distintas secuencias que pliegan en una misma estructura forman lo que se denomina una “red neutral” y están conectadas por mutaciones puntuales que afectan a la secuencia pero no tienen su reflejo en la estructura (como se describirá con más detalle en el apartado 1.6). Aunque estas características se refieren específicamente a la relación entre secuencias de ácidos nucleicos de banda sencilla y sus estructuras secundarias, son cualitativamente extrapolables a las estructuras terciarias, ya que desde el punto de vista termodinámico el 80% de la energía libre correspondiente a una estructura terciaria se debe al apareamiento entre nucleótidos dictado por su estructura secundaria (Schuster et al. 1994, Schuster 1997b).

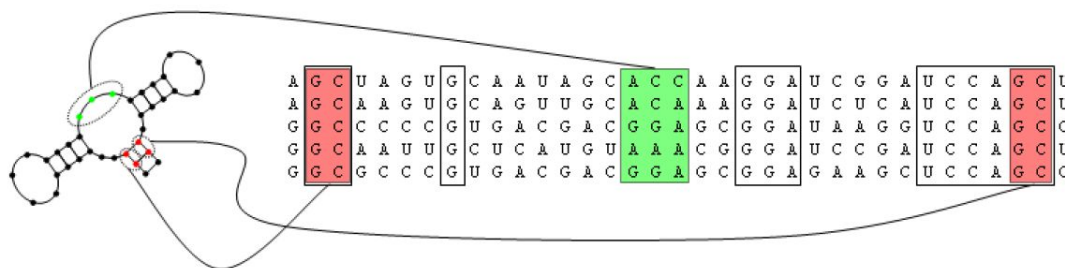


Figura 17. Degeneración de los espacios de secuencias y de estructuras. Ejemplo de diferentes secuencias de RNA que pueden plegarse en una misma estructura secundaria, en este caso de tipo “cabeza de martillo”, y que por tanto serían algunas de las que componen la red neutral correspondiente a tal estructura [figura tomada de (Manrubia and Cuesta 2010)].

Además del diseño clásico de una población combinatorial de DNA que se ha comentado, existe la posibilidad de utilizar un diseño diferente para la obtención de la población de inicio:

- Poblaciones parcialmente al azar o “dopadas”. Se trata de puntos de partida útiles para la definición de las secuencias o estructuras implicadas en la unión con el ligando de aptámeros previamente seleccionados, así como para la obtención de variantes con mayor afinidad de aptámeros ya existentes (Robertson and Joyce 1990, Famulok 1994, Landweber 1999, Robertson et al. 2004, Kulbachinskiy 2007). Como consecuencia, se trata de poblaciones en las que la proporción de secuencia al azar debe ser suficientemente elevada como para permitir la exploración de nuevos fenotipos, pero sin sobrepasar los límites en que las secuencias dejen de ser funcionales. Como norma general, la fracción de posiciones mutadas al azar en la secuencia se sitúa entre el 5 y el 30% de ella, de forma que se mantiene el número de posiciones imprescindibles para la función (que suelen oscilar entre el 70 y el 95% de la secuencia) (Hall et al. 2009).

- Poblaciones segmentadas al azar (*Segmentally random sequence pools*). Se trata de poblaciones útiles cuando se conoce una región de unión al ligando dentro de la secuencia del aptámero, pero se sospecha que una porción de la misma es especialmente importante para su función. Para ello, estas poblaciones están compuestas por tramos cortos de secuencias al azar. Así, si se desea definir mejor un sitio de unión conocido, se utilizarán tramos aleatorizados de entre 4 y 10 nt, ya que tramos mayores (por ejemplo, 20 nt) pueden llevar a la selección de sitios de unión nuevos en lugar de a variantes del sitio ya conocido (Hall et al. 2009).

- Poblaciones quiméricas (*Chimeric SELEX*). Este tipo de poblaciones son útiles para la obtención de aptámeros con más de un sitio de unión. Para ello se utilizan poblaciones de aptámeros seleccionados previamente para unir cada uno de los ligandos deseados y se realiza una fusión de

dichas poblaciones para conseguir aptámeros quiméricos a partir de ellas (Stoltenburg et al. 2007, Aquino-Jarquin and Toscano-Garibay 2011, McKeague and Derosa 2012).

- Poblaciones restringidas estructuralmente. Este tipo de poblaciones son de gran utilidad en caso de conocer la estructura secundaria del ácido nucleico que se une a la diana. Están compuestas por secuencias variables flanqueadas por secuencias fijas que producen las estructuras secundarias prefijadas (por ejemplo, un dominio tallo-lazo o una horquilla) (Kikuchi et al. 2003, Klussmann 2006, Kulbachinskiy 2007).

- Poblaciones basadas en secuencias genómicas (*Genomic SELEX*). Son útiles para la búsqueda de sitios de unión de diferentes proteínas (entre ellas, factores de transcripción y de traducción) en DNA genómico y RNA (Djordjevic 2007, Kulbachinskiy 2007). Este tipo de poblaciones, propuestas en primer término por Dobbstein y Shenk (Dobbstein and Shenk 1995), presentan como característica fundamental y diferenciadora que la población inicial utilizada procede del genoma del organismo de interés (Stoltenburg et al. 2007, Aquino-Jarquin and Toscano-Garibay 2011, McKeague and Derosa 2012).

1.4.5. Sistemas de selección de aptámeros con el fenotipo deseado

Los métodos de selección de aptámeros abarcan un extenso número de técnicas diferentes, que en todos los casos buscan obtener las moléculas de ácido nucleico con mayor afinidad y especificidad por su diana, descartando el resto de las producidas durante las etapas de amplificación.

Las condiciones en las que se lleva a cabo la selección de los aptámeros influyen de modo determinante en la estructura que adoptan en el medio y, como consecuencia, en la afinidad y especificidad resultantes (Kulbachinskiy 2007). Así, durante la selección de aptámeros se pueden modificar diferentes parámetros tales como condiciones salinas, temperatura, tiempo de incubación o pH, según los resultados que se desee obtener. Por lo general, la presión selectiva hacia el fenotipo deseado es aumentada progresivamente a lo largo de los ciclos de selección, bien mediante la reducción de la concentración relativa de diana con respecto al aptámero en las últimas rondas de SELEX, bien cambiando las condiciones de unión y lavado (composición de tampón, volumen, tiempo) (Marshall and Ellington 2000) de forma que solamente los aptámeros con mayor afinidad por su ligando continúen el proceso de selección-amplificación.

En el caso de que la diana se encuentre libre en solución en vez de unida a un soporte, para eliminar las moléculas de ácidos nucleicos no funcionales lo más habitual es utilizar la ultrafiltración con filtros de nitrocelulosa, que permiten la separación molecular en función de su

tamaño: los complejos aptámero-diana quedarán retenidos mientras que los aptámeros no unidos pasarán a través del filtro y, por tanto, serán descartados. Por el contrario, durante los procesos en los que la diana se encuentra inmovilizada sobre un determinado soporte, el método elegido para la partición (es decir, la separación entre aptámeros funcionales y ácidos nucleicos no funcionales) será el más adecuado en función de las características de dicho soporte, incluyendo la filtración ya mencionada, la cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa o agarosa, la utilización de partículas magnéticas o de nanopartículas de oro, el empleo de microplacas, la electroforesis capilar, el ensayo de retardo en geles de electroforesis (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) o la resonancia de plasmón superficial (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) (Moreno et al. 2003, Mendonsa and Bowser 2004, Stoltenburg et al. 2007, Mairal et al. 2008, Sanchez-Luque et al. 2014). En todos los casos, como se mencionó anteriormente, se realiza un número variable de lavados en cada ciclo en función de la astringencia que desee aplicarse al proceso de selección.

Una vez descartadas las moléculas de ácido nucleico no unidas a la diana, en la mayoría de las ocasiones, aunque no siempre (Bruno 1997, Moreno et al. 2003, Ramos et al. 2010), los DNAs o RNAs funcionales han de ser separados o eluidos de su diana para poder amplificarlos (Yang et al. 2007). Al igual que en el caso de la partición de las moléculas no funcionales, para eluir las moléculas que sí se han unido a la diana pueden emplearse diferentes métodos, todos ellos basados en la desnaturalización del aptámero para que se libere de la diana. Entre ellos destacan el tratamiento térmico en agua (Stoltenburg et al. 2005) o la adición de agentes desnaturalizantes como urea, formamida, SDS o EDTA (Weiss et al. 1997, Bianchini et al. 2001, Theis et al. 2004). Además, se puede aprovechar la afinidad del ligando por el aptámero para su elución mediante técnicas cromatográficas (Geiger et al. 1996) o bien usar ligandos competitivos (Bridonneau et al. 1999). Una vez realizada la separación de las moléculas funcionales, el siguiente paso del ciclo del SELEX consiste en la amplificación de las moléculas seleccionadas para continuar el proceso de selección.

1.4.6. Métodos de amplificación de las moléculas seleccionadas

Los aptámeros con el fenotipo deseado se encuentran por lo general en muy baja proporción en la población inicial lo que hace necesario que, tras su selección, deban ser amplificados para conseguir enriquecer la población en moléculas con afinidad por el ligando. Lo más habitual es que dicha amplificación se lleve a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo necesarias una retrotranscripción (RT) previa y una transcripción posterior (IVT) en el caso de estar trabajando con aptámeros de RNA (Ellington and Szostak 1990, Tuerk and Gold 1990), como se mostró esquemáticamente en las Figuras I5 e I6.

Un método de amplificación alternativo para aptámeros de RNA es el llamado “sistema de amplificación de secuencias de modo isotérmico”, que evita tanto el paso de desnaturalización como la utilización de termociclador (Guatelli et al. 1990). La amplificación isotérmica se lleva a cabo a 37°C y en ella actúan conjuntamente tres enzimas: la retrotranscriptasa, la RNasa H de *E. coli* y la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Así, una vez retrotranscrito el RNA a cDNA, la RNasa H degrada el RNA y puede tener lugar la síntesis de la segunda cadena del DNA catalizada por la propia retrotranscriptasa. A partir del dsDNA [obtenido con menor rendimiento que usando PCR (Burke and Berzal-Herranz 1993)] se obtiene de nuevo el RNA por acción de la T7 RNA polimerasa dado que durante el proceso se ha introducido la correspondiente secuencia promotora.

Otro de los métodos isotérmicos es el conocido como LAMP (*Loop-mediated isothermal AMPlification*), que amplifica secuencias nucleotídicas específicas mediante una reacción de desplazamiento de cadena autociclada, en un proceso llevado a cabo en menos de una hora y a una temperatura en torno a 60°C. Los resultados de este tipo de amplificación pueden ser visualizados directamente midiendo la turbidez adquirida por la mezcla de reacción (por precipitación del pirofosfato liberado durante el proceso), o también pueden añadirse marcadores como el agente intercalante *SYBR green* para el seguimiento del mismo (Notomi et al. 2000). Además, existe una variedad de este ensayo, llamada RT-LAMP (Parida et al. 2004), que incluye un paso de retrotranscripción y que ha sido aplicada para la detección de RNA genómico del virus de la fiebre aftosa (*foot-and-mouth disease virus*, FMDV) (Jamal and Belsham 2013).

Sea cual sea el procedimiento empleado, una vez amplificadas las moléculas (de ssDNA o RNA) seleccionadas, éstas pueden ser sometidas a un nuevo ciclo de selección para continuar con el enriquecimiento de la población en moléculas activas. El número final de rondas de selección-amplificación dependerá de parámetros tales como el diseño de la población combinatorial inicial, las condiciones de selección, la eficiencia del método de separación de moléculas activas e inactivas, las características y concentración de la molécula diana o la concentración relativa diana:aptámero (Stoltenburg et al. 2007).

1.4.7. Análisis de las secuencias y estructuras obtenidas

Una vez concluido el proceso de selección-amplificación es necesario analizar la población de aptámeros obtenidos, tanto a nivel de genotipo (secuencia) como de fenotipo (estructura y afinidad/especificidad por el ligando). El número de aptámeros diferentes obtenidos es una función tanto de las propias características de la interacción aptámero-diana como de la astringencia de la selección, y habitualmente puede variar de 1 a 10^6 (Conrad et al. 1995). Para analizar una fracción

del repertorio de aptámeros obtenidos se puede realizar la secuenciación y análisis de 30 o más clones moleculares (Stoltenburg et al. 2007), si bien actualmente es posible analizar en profundidad la población gracias a las técnicas de secuenciación masiva (Bayrac et al. 2011).

En cuanto al análisis de la diversidad de secuencias obtenidas mediante clonaje molecular, una de las herramientas más útiles es ClustalW (Thompson et al. 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Este programa realiza alineamientos múltiples de secuencias y muestra los resultados de forma agrupada en caso de que posean un número suficiente de posiciones ocupadas por los mismos nucleótidos, pudiendo llegar a identificarse patrones de secuencias o regiones altamente conservadas entre los grupos de aptámeros. Con ello puede estimarse cuáles son las regiones relacionadas con la unión a la diana, en base a los tramos nucleotídicos conservados presentes en las secuencias analizadas (Thompson et al. 1994, Stoltenburg et al. 2007).

Otros programas relevantes para el estudio de los ácidos nucleicos (y en particular de los aptámeros) son los que analizan la estructura secundaria de las secuencias, ya que proporcionan información sobre la estabilidad termodinámica de los aptámeros y pueden incluso permitir la identificación de los lugares más probables para que se produzca la unión aptámero-ligando. Uno de los servidores informáticos más utilizados es *RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) (Schuster et al. 1994, Zuker 2003, Lorenz et al. 2011), que toma como punto de partida una gran base de datos experimentales sobre la estabilidad termodinámica de distintos motivos estructurales del RNA, y utiliza algoritmos de mínima energía libre y una función de partición para calcular las estructuras secundarias de moléculas de RNA. Otro de los programas más útiles es *mfold* (disponible en el servidor *UNAFold*: <http://mfold.rna.albany.edu>) (Zuker 2003), que en el caso del ssDNA permite variar los parámetros de temperatura y las condiciones iónicas (de los cationes Na^+ y Mg^{2+}). Programas y servidores adicionales desarrollados con este fin son *RNAsoft* (www.rnasoft.ca), *GeneBee* (http://www.genebee.msu.su/services/rna2_full.html), o *Predict a Secondary Structure* (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>).

El análisis de secuencias y estructuras puede completarse mediante programas de comparación y *clustering* de las mismas, lo que permite profundizar sobre los procesos evolutivos llevados a cabo durante el proceso de selección-amplificación, tal como se ha demostrado recientemente en un trabajo que ha desarrollado aptámeros de RNA contra la región 5'-UTR del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) (Sanchez-Luque et al. 2014).

1.4.8. Variantes del sistema SELEX

El método SELEX ha avanzado rápidamente desde que se describió en 1990, desarrollándose variantes alternativas con diferentes aplicaciones. Las principales [revisadas en (Stoltenburg et al. 2007, Aquino-Jarquin and Toscano-Garibay 2011, McKeague and Derosa 2012)] son las siguientes:

- Negative-SELEX. Es una modificación del SELEX clásico para evitar interacciones inespecíficas de los aptámeros. Se realiza incluyendo un paso adicional, normalmente en el inicio de la selección, que elimina los aptámeros con afinidad por la matriz de selección (al incubarlos previamente con ella, en ausencia de diana). Fue utilizado por primera vez por Ellington y Szostak en 1992 (Ellington and Szostak 1992), obteniendo aptámeros diez veces más afines en comparación con los producidos por SELEX clásico.

- Counter-SELEX. Esta técnica emplea rondas adicionales de SELEX para eliminar secuencias que se unen a estructuras semejantes a la diana, con lo que se aumenta la especificidad de los aptámeros obtenidos. Fue establecida por Jenison y colaboradores (Jenison et al. 1994) cuando identificaban aptámeros para cafeína, usando teofilina (con la que difiere en un único grupo metilo) como molécula en la contraselección.

- Blended SELEX. Método que incorpora unidades funcionales distintas de los ácidos nucleicos (por ejemplo, péptidos) a la población para aumentar el repertorio de estructuras y posibles interacciones disponibles (Smith et al. 1995). Una variante incluye factores de transcripción y optimiza la actividad de los aptámeros para aplicaciones en terapia génica (Martell et al. 2002).

- Covalent/Crosslinking SELEX. Se utiliza para seleccionar aptámeros que contienen grupos reactivos de naturaleza no nucleotídica, capaces de unirse covalentemente (mediante *crosslinking*) a una proteína diana (Jensen et al. 1995).

- Photo-SELEX. Relacionada con la anterior, se basa en la sustitución de una de las bases de los ácidos nucleicos en la población por un nucleótido que se activa por luz a una determinada longitud de onda (Jensen et al. 1995). Normalmente se emplea 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), que absorbe la luz UV a longitudes de onda en torno a 310 nanómetros (nm). Mediante este método se consiguen aptámeros con más afinidad y especificidad, dada la capacidad de éstos para formar enlaces covalentes foto-inducidos con la molécula diana (Yang et al. 2007).

- Spiegelmer Technology. La selección se realiza empleando ácidos nucleicos naturales, que por tanto contienen el isómero D de los nucleótidos, pero utilizando como molécula diana el

enantiómero opuesto de la molécula deseada (que, lógicamente, debe ser quiral). Una vez terminado el proceso, los aptámeros con mayor afinidad obtenidos se sintetizan como isómeros L, que son capaces de unirse al enantiómero deseado de la diana. Este ingenioso sistema fue puesto a punto por Klussmann y sus colaboradores (Klussmann et al. 1996, Eulberg and Klussmann 2003) y permite evitar la degradación del aptámero por nucleasas, puesto que las RNasas y DNasas naturales son inactivas frente a los isómeros L del RNA y del DNA, respectivamente.

- *In vivo SELEX*. Este método utiliza un procedimiento iterativo que incluye una transfección en células (generalmente, de vertebrados) cultivadas, para seleccionar señales de procesamiento de RNA (Coulter et al. 1997).

- *Automated SELEX*. Utiliza sistemas automatizados a lo largo del procedimiento para reducir el tiempo necesario hasta obtener los aptámeros deseados. Los primeros en emplearlo fueron Ellington y sus colaboradores, usando una estación de trabajo Beckman Biomek 2000 modificada (Cox et al. 1998).

- *Deconvolution SELEX*. Se usa para seleccionar aptámeros dirigidos contra dianas complejas presentes en mezclas de moléculas o en medios celulares. Consiste en la realización de un SELEX clásico pero incluyendo una selección secundaria una vez generados los aptámeros, para discriminarlos de los oligonucleótidos que se unen a otros componentes de la mezcla donde se realiza la selección (Morris et al. 1998). Para ello ha de evaluarse la capacidad de unión específica a la diana de los aptámeros seleccionados, o bien realizar una incubación de la última población seleccionada con la mezcla de reacción para identificar posibles dianas alternativas en dicha mezcla (Torres-Chavolla and Alocilja 2009).

- *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)-SELEX*. La separación de moléculas unidas y no unidas se realiza en cada ronda a través de electroforesis en condiciones nativas, separando los aptámeros activos e inactivos por la diferencia en peso molecular del complejo y el aptámero libre (Tsai and Reed 1998, Sterba et al. 2003, Beinoravičiūtė-Kellner et al. 2005). Existe una modificación de EMSA-SELEX (*SELEX-Seq*) basada en la utilización de las técnicas de secuenciación masiva. Tras la separación de las moléculas no unidas mediante EMSA, se lleva a cabo la caracterización de 10^6 moléculas o más de cada ronda de selección. Esta variante permite la identificación de los sitios de unión de los aptámeros tras solamente una o dos rondas de selección (Riley et al. 2014).

- *Capillary Electrophoresis (CE)-SELEX*. Consiste en la utilización de electroforesis capilar para separar aptámeros unidos y no unidos a la diana, en función de su diferencia de movilidad.

Este método fue empleado por primera vez para aislar aptámeros con capacidad de reconocimiento de la IgE humana (Mendonsa and Bowser 2004).

- Non-SELEX. Es una variación de CE-SELEX que incluye pasos repetitivos de separación sin fase de amplificación entre ellos. Concretamente, sus autores observaron que tres etapas de incubación-partición mediante electroforesis capilar sin equilibrio (*non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures*, NECEEM) mejoraban la afinidad de la población de DNA en más de cuatro órdenes de magnitud (Berezovski et al. 2006).

- RAPID (RNA APtamer Isolation via Dual-cycles)-SELEX. Se trata de un procedimiento de Non-SELEX que incluye pasos de amplificación cuando hay un alto número de copias de ciertas secuencias o cuando se necesita una población con mayor concentración de aptámeros (Szeto et al. 2013).

- Cell-SELEX o CS-SELEX (Cell specific SELEX). Utiliza células enteras como diana global de selección, de forma que los aptámeros suelen interaccionar con proteínas de la superficie celular o bien con estructuras extracelulares como el peptidoglicano de las bacterias. Fue desarrollada en 1999 (Homann and Goring 1999) y retomada en 2008 (Shangguan et al. 2008).

- Target Expressed on the Cell Surface (TECS)-SELEX. En esta variante, similar a la de Cell-SELEX, las dianas se expresan directamente sobre una superficie celular, pudiendo ser proteínas naturales o recombinantes, y bien del mismo o de otro tipo celular (Ohuchi et al. 2006).

- Multi Stage SELEX. Variante de SELEX para obtener aptámeros con afinidad por diferentes dianas de forma simultánea. Para ello se parte de aptámeros previamente obtenidos para cada una de las dianas por separado, que se fusionan en una sola población y sobre ella se realiza una nueva selección frente a todas las dianas deseadas (Wu and Curran 1999).

- Toggle SELEX. Es una variante del SELEX tradicional que permite la obtención de aptámeros contra una molécula y además otras relacionadas estructuralmente con ella (Bianchini et al. 2001, White et al. 2001). La selección se lleva a cabo alternando ciclos con las dianas en cuestión, por lo que generalmente los aptámeros obtenidos reconocen dominios conservados entre las diferentes dianas (Yang et al. 2007). Este sistema permite conseguir aptámeros que actúan como poblaciones “policlonales” que podrían eventualmente ser separadas de forma individual. Por ejemplo, en uno de los primeros experimentos realizados, se obtuvieron aptámeros que reconocían tanto la trombina humana como la porcina (Bianchini et al. 2001, White et al. 2001).

- Multiple-Target High-Throughput SELEX. Su objetivo es obtener simultáneamente varios aptámeros para diferentes dianas, reduciendo los tiempos de selección y caracterización por

combinación de distintas técnicas como, por ejemplo, la secuenciación masiva y el método conocido como *HAPIScreen* (*High throughput APTamer Identification screen*), que permite la rápida identificación de un gran número de aptámeros (Roulet et al. 2002, Dausse et al. 2011).

- *Indirect SELEX*. Fue desarrollada en el año 2000 (Kawakami et al. 2000) usando Zn^{2+} como inductor de la unión de aptámeros a la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), obteniendo por tanto aptámeros anti-Tat dependientes de Zn^{2+} .

- *Conditional SELEX*. Permite la selección de aptámeros de forma que, en presencia de ligando, la unión puede detectarse gracias al aumento o descenso de una señal detectable inducida por una molécula reguladora (Vuyisich and Beal 2002, Smith and Gold 2004).

- *Tailored SELEX*. Esta variante del SELEX clásico, también conocida como *primer-free SELEX*, es un método integrado que permite el aislamiento de aptámeros con solamente 10 nt constantes flanqueando la región variable de la secuencia (Vater et al. 2003). Esto se consigue mediante la ligación y escisión de los nucleótidos flanqueantes correspondientes a la secuencia de unión de los cebadores antes y después del paso de amplificación, respectivamente, por lo que en la estructura del aptámero durante la fase de selección no intervienen tales nucleótidos flanqueantes.

- *FluMag SELEX*. Su nombre deriva de sus principales características: por un lado, la población combinatorial con la que se inician los ciclos de selección-amplificación de los aptámeros está modificada de tal manera que las secuencias incluyen fluoróforos para poder realizar una cuantificación de las mismas; por otra parte, la diana se inmoviliza en la superficie de partículas magnéticas, lo que permite una rápida y eficiente separación así como el uso de pequeñas cantidades de diana (Stoltenburg et al. 2005). Posteriormente ha aparecido una variante de este método llamada *Capture SELEX* (Stoltenburg et al. 2012) en la que son los oligonucleótidos los que se inmovilizan en lugar de la diana.

- *MonoLEX*. Combina un solo paso de cromatografía de afinidad seguida de una separación física del soporte (resina) y un solo paso de amplificación final de los aptámeros unidos a cada una de las secciones fragmentadas. Con ello se obtienen aptámeros con mayor afinidad sin hacer una nueva selección (Nitsche et al. 2007).

- *NanoSelection o nano-Manipulator/Atomic Force Microscopy selection (nM-AFM)-SELEX*. Método que ofrece la posibilidad de aislar aptámeros individuales. Se realiza una única ronda de selección, partiendo de una población de oligonucleótidos marcados fluorescentemente, sobre partículas con la diana unida. Los complejos aptámero-diana se observan por microscopía de fluorescencia o por microscopía de fuerza atómica (AFM) para extraer partículas individuales con

el aptámero correspondiente unido, el cual es sometido a amplificación por PCR (Peng et al. 2007). La variante de esta técnica que utiliza únicamente una ronda de selección en AFM para el aislamiento de aptámeros se conoce como *AFM-SELEX* (Miyachi et al. 2010).

- *Microfluidics (M)-SELEX*. Usa tecnologías microfluídicas, creando una plataforma automática y en miniatura de SELEX para un rápido escaneo de los aptámeros (Lou et al. 2009).

- *Next Generation (NG)-SELEX*. En 2009 emergió un tipo de SELEX derivado del cDNA/Genomic SELEX (Reid et al. 2009) en el que la población combinatorial se diseña cubriendo una secuencia de pre-mRNA. Las subpoblaciones unidas y no unidas son cuantificadas por *microarrays* de DNA empleando dos marcadores fluorescentes.

- *High-Fidelity (Hi-Fi)-SELEX*. Modificación del SELEX clásico que combina una población inicial con elementos fijados para mejorar el rendimiento con la unión de la diana a una superficie que inhibe la unión inespecífica de los aptámeros. Además, la amplificación de los aptámeros se realiza mediante la PCR de alta fidelidad conocida como PCR digital droplet (Ouellet et al. 2015).

Además de todas estas variantes del proceso, cabe mencionar aquí dos grandes bloques dentro del procedimiento de SELEX: la selección continua y la selección discontinua. La selección continua fue desarrollada en 1997 (Wright and Joyce 1997). A diferencia de la selección discontinua (o *stepwise*) habitual, en ella todas las fases del proceso *in vitro* se producen (sin pasos de purificación entre ellas) en una misma mezcla de reacción que contiene las enzimas necesarias, los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato), los NTPs (nucleótidos trifosfato) y los iones necesarios para que se lleven a cabo las reacciones de selección, amplificación y diversificación genética (Arenas and Lehman 2010). De esta manera, las secuencias con mayor capacidad para mantenerse en las condiciones de selección establecidas en el medio serán las que se amplifiquen de modo preferente (Schmitt and Lehman 1999). Una ventaja de este método es que permite realizar múltiples rondas de forma continua y con la máxima velocidad, ya que el experimentador únicamente interviene para tomar alícuotas y traspasarlas a medio fresco (Wilson and Szostak 1999). Por el contrario, en la selección discontinua utilizada habitualmente sí se debe intervenir en las diferentes etapas de cada ciclo, por lo que resulta un proceso más lento que el continuo: se requiere uno o más días por ronda frente a, por ejemplo, las 300 rondas que realizaron en solamente dos días Wright y Joyce mediante evolución continua (Wright and Joyce 1997).

1.4.9. Modificación y estabilización de aptámeros

Con el fin de aumentar su estabilidad o facilitar su detección, los aptámeros pueden ser modificados químicamente de diferentes formas que se agrupan en dos estrategias alternativas [revisadas en (Klussmann 2006)]. La primera de ellas consiste en el empleo, durante el proceso de selección o evolución *in vitro*, de oligonucleótidos que incluyen en su secuencia nucleótidos modificados. La principal limitación de esta aproximación es que deben utilizarse DNA y RNA polimerasas especiales que permitan la incorporación de nucleótidos modificados en las diferentes reacciones de amplificación llevadas a cabo durante el proceso (Lakhin et al. 2013). Para evitar la utilización de este tipo de enzimas (cuyo rendimiento es generalmente menor que el de las convencionales) puede utilizarse la segunda estrategia, en la cual los aptámeros son modificados una vez finalizado el proceso de obtención. En este caso, la variedad de modificaciones químicas que pueden introducirse crece significativamente porque no hay restricciones de compatibilidad, aunque lógicamente están limitadas por el hecho de que la modificación no debe afectar ni a la estructura secundaria/terciaria del aptámero ni a la interacción del aptámero con su diana (Kulbachinskiy 2007).

Uno de los fines perseguidos con la modificación de los aptámeros (sobre todo, los de RNA) es el aumento de su estabilidad o de su resistencia a degradación por nucleasas. Para ello se pueden añadir determinados grupos químicos (entre ellos amino, flúor, metilo o metoxi) a la base nitrogenada o al azúcar del nucleótido. Generalmente, estos grupos se introducen en la posición 2' de la ribosa (o de la desoxirribosa), siendo lo más habitual el uso de ribonucleótidos con la modificación 2'-O-metilo (Sayer et al. 2002, Burmeister et al. 2005). También se pueden reemplazar algunos de los nucleótidos del aptámero por monómeros de ácidos nucleicos sintéticos (como los mencionados en el apartado 1.2), siendo especialmente útil el uso de monómeros de LNA debido a su capacidad para estabilizar la estructura de la molécula y conferir resistencia a nucleasas (Klussmann 2006, Briones and Moreno 2012).

Otras modificaciones que protegen del ataque por exonucleasas son las realizadas en el extremo 3' del aptámero, siendo una de las más comunes la unión de timidina invertida (3'-idT) que forma un enlace 3'-3'. De esta forma se produce en el aptámero un doble extremo 5' que obstaculiza la actividad de las exonucleasas que necesitan del reconocimiento del extremo 3' natural de los ácidos nucleicos para su actividad (Agrawal et al. 1988, Goodchild et al. 1988, Stein et al. 1988, Klussmann 2006).

El extremo 5' de los aptámeros también puede modificarse y protegerse del ataque de 5'-3' exonucleasas mediante la unión de diversos compuestos, entre los que se encuentran el

polietilenglicol (PEG) y los grupos amino o fosfato. También se puede unir al extremo 5' colesterol, ácidos grasos, proteínas o policationes, con lo que se aumenta la estabilidad *in vivo* del aptámero y se facilita su transporte al interior de las células, algo imprescindible para la mayor parte de las aplicaciones terapéuticas (Dougan et al. 2000, Marro et al. 2005, Klussmann 2006).

Por último, aunque no se trata de una modificación química en sí misma, cabe señalar en este apartado que en muchos casos se realiza la optimización, *a posteriori*, de la secuencia de los aptámeros obtenidos. El objetivo es determinar la región concreta de unión entre el aptámero y su diana, eliminando las regiones irrelevantes para dicha interacción. La obtención del denominado “aptámero mínimo” permite no solamente una simplificación del aptámero y un menor coste económico en su síntesis sino también, en ocasiones, el aumento de la afinidad aptámero-diana (Burke et al. 1996, Ruckman et al. 1998, Wilson and Szostak 1998, Sanchez-Luque et al. 2014). Recientemente se ha descrito un método que no se basa en la aproximación tradicional de “prueba y error” para eliminar secuencias no funcionales en el aptámero, sino en un análisis *in silico* de las secuencias y estructuras de los aptámeros resultantes del proceso *in vitro* para definir un aptámero mínimo de elevada afinidad por su diana (Sanchez-Luque et al. 2014).

Gracias al uso de este tipo de modificaciones, en las dos últimas décadas los aptámeros han ido incrementando su uso en el ámbito de la biotecnología y la biomedicina, tanto en diagnóstico (utilizando aptámeros en disolución o bien inmovilizados sobre distintos tipos de biosensores) como en terapia (como ejemplifican los aptámeros frente a trombina y frente al factor de crecimiento endotelial vascular) (Klussmann 2006, Wang and Li 2011).

1.5. COMPARACIÓN ENTRE SELECCIÓN Y EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS *IN VITRO*

Uno de los términos englobados dentro del acrónimo “SELEX” es el de “evolución”, ya que desde el principio se asumió que la introducción de mutaciones durante la amplificación sería importante a lo largo del proceso. Sin embargo, el término SELEX es considerado habitualmente como sinónimo de “selección” *in vitro* (Djordjevic 2007). Esto es consecuencia de las bajas tasas de mutación de las enzimas utilizadas para realizar la amplificación durante el proceso (que, como se comentará posteriormente y se muestra en la tabla del Apéndice I, son menores de 10^{-4} sustituciones por nucleótido), no consideradas mutagénicas para fragmentos menores de 500 nucleótidos (Spee et al. 1993). De este modo, aunque la selección *in vitro* de ácidos nucleicos es muy útil desde el punto de vista aplicado, únicamente permite amplificar moléculas que ya estaban presentes (aunque en

muy pequeña proporción) en la población combinatorial de partida y, por tanto, no permite explorar zonas del “espacio de secuencias” diferentes a la región inicial muestreada. Así, en ausencia de una mayor tasa de mutación durante la amplificación, tanto en RNA como en DNA se ven restringidas las capacidades funcionales de las moléculas obtenidas y esto puede impedir encontrar aptámeros optimizados frente a la diana (Joyce 2007).

Como se ha comentado previamente, la evolución biológica puede entenderse como un proceso dinámico en el que la variabilidad de genotipos es probada por la selección natural a nivel de fenotipo, generación tras generación. Algo equivalente ocurre en los procesos de selección-amplificación *in vitro*, en los que las entidades sometidas a selección (artificial, en este caso) son moléculas, concretamente ácidos nucleicos en el presente trabajo.

Por tanto, si la población de RNA o DNA está sometida a un proceso de selección *in vitro* convencional, no podrán explorarse fenotipos diferentes a los ya presentes inicialmente, por lo que en teoría la variabilidad poblacional irá disminuyendo a lo largo de las rondas y quedará reducida finalmente a unos pocos fenotipos adaptados a las condiciones de selección (Goringer et al. 2003, Stoltenburg et al. 2007). Para ampliar las posibilidades funcionales, durante el proceso se puede introducir una fuente constante de variabilidad, gracias al uso de condiciones mutagénicas en una o más de las etapas enzimáticas que se suceden en la fase de amplificación de cada una de las rondas. De esta forma, a la población le es posible desplazarse o “saltar” a regiones diferentes dentro del espacio de secuencias, explorando genotipos alternativos que pueden producir fenotipos con mayor eficiencia (aunque también menor, lógicamente) en la funcionalidad buscada (Joyce 1994). Así, a diferencia de la *selección in vitro* (SELEX convencional), la *evolución in vitro* (SELEX con amplificación mutagénica) puede permitir la obtención de ácidos nucleicos funcionales con características diferentes, lo que resulta interesante explorar comparativamente. Por lo tanto, todos los procesos evolutivos *in vitro* se basan en la introducción de variabilidad en la fase de amplificación. Esto se logra mediante diferentes métodos para incrementar la mutagénesis o la tasa de recombinación de las enzimas (Stemmer 1994, Wilson and Szostak 1999, Joyce 2004, Tavitian and Haberkorn 2009, Ruiz-Mirazo et al. 2014). Además, existen dos aproximaciones alternativas para que la propia población de partida muestre diferentes grados de variabilidad. La primera de ellas consiste en iniciar el proceso con una población combinatorial relativamente pequeña de secuencias cortas (por ejemplo, 10^7 secuencias de unos 20-30 nt en su región aleatoria), una situación opuesta a los casos en que se comienza con una población mayor y de moléculas más largas (aproximadamente 10^{15} oligonucleótidos de unos 100 nt aleatorios en un total de unos 175 nt) (Lorsch and Szostak 1994, Dubertret et al. 2001). Como consecuencia, la fracción del espacio de

secuencias cubierto en el primer caso es mucho mayor, a pesar de partir de menor cantidad de ácido nucleico utilizado. Una representación esquemática de la diferencia entre los procesos de selección y evolución *in vitro* planteados en este trabajo se muestra en la Figura I8.

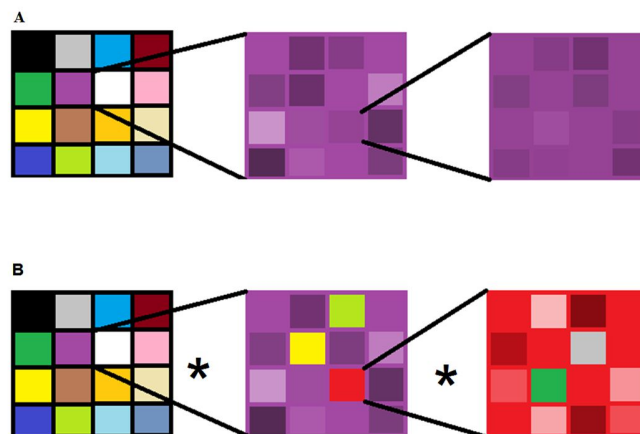


Figura I8. Representación esquemática de procesos de selección (A) y evolución (B) *in vitro*. Los recuadros grandes representan gráficamente el espacio de secuencias posible para una longitud dada de ácido nucleico, y los cuadrados interiores de colores indican diferentes “regiones” o “subespacios” hipotéticos dentro de dicho espacio (que, en realidad, también serán heterogéneos internamente) utilizados como punto de partida del proceso. Las moléculas escogidas en cada caso (representadas por un color morado en ambas poblaciones de partida) son amplificadas paso a paso, tanto en ausencia de mutaciones durante la selección (A) como introduciendo mutaciones (variante indicada con un asterisco) en el proceso de evolución (B). Así, partiendo de un mismo subespacio de secuencias, en el proceso selectivo se va profundizando dentro de la población escogida en primer lugar (lo que se representa mediante tonos morados progresivamente más homogéneos) mientras que la evolución permite ir “saltando” dentro del espacio de secuencias para originar subpoblaciones (de diferentes colores en este esquema) más heterogéneas. Con ello, la evolución *in vitro* permite que puedan aparecer aptámeros de secuencias muy diferentes a los tomados inicialmente de la población inicial, siempre que su afinidad por el ligando les permita resistir las fases de selección.

Una vez determinado el tipo de población combinatorial de partida, ha de fijarse la tasa de mutación que se utilizará a lo largo del proceso. La tasa de error ideal para las enzimas utilizadas en el proceso SELEX evolutivo debería ser aquélla que permitiese introducir, de media, alrededor de una mutación por molécula amplificada, ya que dicha frecuencia tendría como resultado la producción de un elevado número de variantes mutantes sin comprometer (en teoría) la viabilidad de las secuencias generadas (Joyce 2007). No obstante, dado que las moléculas que se encuentran en mayor proporción en la población de partida de cada ronda tienen una probabilidad mayor de ser amplificadas y, por tanto, de sufrir mutaciones, con la amplificación mutagénica éstas podrían perder la ventaja que en principio tienen sobre el resto de las secuencias. En cualquier caso, la

introducción de mutaciones se produce al azar a lo largo de cada secuencia, por lo que es difícil predecir el efecto de las mismas en la estructura y la función de las moléculas que constituyen la población sometida a evolución *in vitro*.

El procedimiento más ampliamente utilizado para introducir variabilidad genética durante el proceso evolutivo consiste en la modificación de la fidelidad de la amplificación por PCR (Lin-Goerke et al. 1997, Yu et al. 2009, Zhong et al. 2011). Existe gran variedad de alternativas para la realización de PCRs mutagénicas (Joyce 2007), dado que la fidelidad del proceso no depende únicamente de la tasa de error intrínseca de la DNA polimerasa utilizada, sino que varía en función de las condiciones de la reacción, del número de ciclos utilizados en la PCR y del tamaño de la población inicial (Reiss et al. 1990, Eckert and Kunkel 1991).

Aunque la enzima más utilizada para la amplificación por PCR es la DNA polimerasa *Taq*, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Chien et al. 1976), cuya tasa de mutación es, de media, de $1,3 \times 10^{-5}$ mutaciones introducidas por nucleótido copiado y ciclo de amplificación, existen diferentes DNA polimerasas con mayor y menor tasa de mutación, tal como se expone en el Apéndice I. Entre las DNA polimerasas con menor fidelidad de copia incluso en condiciones estándar de reacción (denominadas genéricamente “DNA polimerasas hipermutagénicas”), puede citarse la enzima *Mutazyme II* (de Agilent Technologies) que posee una tasa de error de 1×10^{-3} a $1,6 \times 10^{-2}$ por nucleótido copiado y ciclo de amplificación, dependiendo de la cantidad de DNA inicial. Así, el uso de una DNA polimerasa hipermutagénica es una de las formas de introducir mayor variabilidad durante un proceso de evolución *in vitro*.

Por otra parte, se han descrito distintos agentes mutagénicos que aumentan la tasa de mutación asociada a la replicación del DNA catalizada por cualquier polimerasa (Coia et al. 2009, Dapp et al. 2009, Moreno et al. 2011a). Entre ellos se encuentran determinados análogos de nucleótidos, que compiten con los nucleótidos naturales por su introducción en la cadena que se está elongando y generan mutaciones al potenciar la introducción de nucleótidos incorrectos en la hebra complementaria. Dos ejemplos que pueden citarse son los que contienen un grupo hidroxilo en la base nitrogenada, 2-OH-dATP (Kamiya et al. 2004) y 8-OH-dGTP (Kamiya et al. 2007), que introducen mutaciones al azar en el proceso. Si se desea modular el tipo de mutaciones introducidas durante la amplificación, puede utilizarse uno de los cuatro dNTPs naturales en cantidades limitantes respecto a los otros tres, suplementando la mezcla de reacción con 2'-desoxiinosina-5'-trifosfato (dITP): este nucleótido puede ser introducido por la *Taq* DNA polimerasa, aunque con menor eficiencia que los naturales, de tal modo que cuando la enzima incluye en un ciclo dITP por

carencia del dNTP limitante, en el siguiente ciclo se incorporará cualquiera de los otros tres dNTPs (o incluso el propio dITP), produciéndose la mutación (Spee et al. 1993, Kuipers 1996).

Otras modificaciones de la PCR que reducen su fidelidad de copia incluyen el incremento de la concentración de DNA polimerasa, los cambios en las proporciones de los dNTPs sin adición de dITP, el aumento del tiempo de extensión durante los ciclos, el incremento del número de ciclos, la disminución de la temperatura de anillamiento de los cebadores, las variaciones de pH, el aumento en la concentración de magnesio (Mg^{2+}), así como la adición de cationes normalmente ausentes en la reacción como níquel (Ni^{2+}), manganeso (Mn^{2+}) o hierro (Fe^{3+}) (Leung et al. 1989, Eckert and Kunkel 1990, 1991, Bebenek et al. 1992, Cadwell and Joyce 1992, 1994, Innis et al. 1995, Pavlov et al. 2004). Respecto al Mg^{2+} , catión que normalmente se añade como $MgCl_2$ a la reacción, es un componente esencial para la polimerización de DNA ya que influye en el anillamiento de los cebadores, la separación de las cadenas durante la desnaturalización del dúplex, la especificidad de producto y la formación de dímeros de cebadores, así como en la estabilidad de la estructura funcional de la propia DNA polimerasa (Mulhardt 2010). La proporción de mutaciones introducidas por aumento en la concentración de $MgCl_2$ depende de dicha concentración en relación a la concentración de dNTPs totales presentes en la mezcla de reacción (Eckert and Kunkel 1990).

Las PCRs en las que se modifican las condiciones estándar de la reacción son conocidas en conjunto como “PCRs mutagénicas” o “*error-prone PCRs*” (Pritchard et al. 2005). Entre ellas, el primer protocolo descrito (Leung et al. 1989) incluía simultáneamente varias modificaciones del proceso: aumentar la concentración de *Taq* DNA polimerasa, el tiempo de extensión y la concentración de $MgCl_2$, añadir $MnCl_2$ a una concentración 0,5 milimolar (mM), e incrementar a 1 mM la concentración de dGTP, dCTP y dTTP manteniendo la concentración estándar de dATP (0,2 mM). Con todo ello se aumentó la tasa de mutación del proceso tres órdenes de magnitud, hasta un valor de $1,4 \times 10^{-2}$ mutaciones introducidas por nucleótido copiado y ciclo de amplificación, con un exceso sustancial de transiciones A→G y T→C. Tomando como punto de partida este trabajo, Cadwell y Joyce realizaron una PCR mutagénica similar cuyo protocolo es considerado como la referencia en este campo (Cadwell and Joyce 1992). Posteriormente, estos mismos autores utilizaron una concentración de 7 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de $MnCl_2$, 1 mM de dCTP y 1 mM de TTP, en presencia de 5 unidades de *Taq* polimerasa. Con ello obtuvieron una tasa de error de $6,6 \times 10^{-3}$ por posición durante la PCR (valor determinado al final del proceso) y con preferencia por las transversiones A→T y T→A (Cadwell and Joyce 1994).

Por otra parte, dado que las DNA polimerasas requieren la presencia de un catión divalente para el mantenimiento de su estructura funcional, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la

influencia de estos iones en la amplificación del DNA, comprobándose en muchos casos que resultan mutagénicos (y en ocasiones carcinogénicos *in vivo*), ya que disminuyen la fidelidad de las polimerasas (Sirover and Loeb 1976, Beckman et al. 1985). Entre dichos estudios se ha probado la sustitución total o parcial del Mg^{2+} por Mn^{2+} en las amplificaciones catalizadas por diferentes enzimas: DNA polimerasa I de *E. coli* (Dube and Loeb 1975, Weymouth and Loeb 1978, Kunkel and Loeb 1979, El-Deiry et al. 1984), DNA polimerasa del virus de mieloblastosis aviar (Sirover and Loeb 1977), DNA polimerasas humanas α y β (Chang and Bollum 1973), DNA polimerasa del bacteriófago T4 (Hall and Lehman 1968, Goodman et al. 1983) y DNA polimerasa *AmpliTaq* (Lin-Goerke et al. 1997). La sustitución de Mg^{2+} por Mn^{2+} se ha realizado en ocasiones modificando también las condiciones de PCR, como en los casos antes mencionados (Leung et al. 1989, Cadwell and Joyce 1992), o en presencia de nucleótidos modificados como el 8-OH-dGTP (Kamiya et al. 2007).

1.6. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS PARA ANALIZAR LA SELECCIÓN Y EVOLUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS *IN VITRO*

La Bioinformática es una rama de la ciencia que se ha desarrollado ampliamente durante las últimas décadas, convirtiéndose en un elemento imprescindible en las áreas de la biología molecular, la biotecnología y la biomedicina. Entre sus objetivos destacan la organización y análisis de los resultados obtenidos en el trabajo científico experimental. En lo relacionado con el presente trabajo, esto incluye no solamente la clasificación y almacenamiento en bases de datos de la información de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, sino también la predicción de estructuras secundarias y terciarias de biomoléculas, las comparaciones entre secuencias y estructuras de poblaciones de ácidos nucleicos, el análisis cualitativo y cuantitativo de los resultados obtenidos en diferentes experimentos, así como todos los trabajos computacionales o *in silico* que redunden en una mejor comprensión e interpretación de la información generada por los investigadores experimentales.

Los métodos bioinformáticos permiten el análisis rápido de un gran volumen de información, referida en el ámbito de los aptámeros a secuencias de DNA o de RNA obtenidas mediante selección o evolución *in vitro*. Así, la bioinformática puede facilitar la elección de una población inicial teóricamente adecuada a los resultados finales que se desea obtener, la comparación de las secuencias y/o estructuras de los ácidos nucleicos obtenidos durante el proceso, o la optimización de los aptámeros producidos mediante retroalimentación entre los datos experimentales y las simulaciones *in silico*. Además de las diferentes bases de datos que permiten la

búsqueda de aptámeros concretos y los artículos en los que fueron descritos [como *Aptamer Database* creada por grupo de Ellington (Lee et al. 2004), o *Aptamer Base* (<http://aptamerbase.semanticscience.org/>) (Cruz-Toledo et al. 2012)], las herramientas informáticas disponibles para el trabajo con aptámeros pueden facilitar y sistematizar todo el proceso de selección o evolución *in vitro*.

Uno de los conceptos relevantes cuando se trabaja con poblaciones de ácidos nucleicos es la relación que existe entre sus secuencias y las estructuras en que éstas se pliegan. Como se adelantó en el apartado 1.4.4, los ácidos nucleicos de cadena sencilla (RNA y ssDNA) pueden plegarse en diferentes estructuras secundarias dictadas por la complementariedad de bases nucleotídicas, y entre ellas serán más estables aquéllas que al formarse produzcan una disminución de energía libre (ΔG) más acusada (Fontana and Schuster 1998). Es destacable el hecho de que diferentes secuencias de RNA o ssDNA pueden tener una misma estructura secundaria como la de máxima estabilidad, por lo que tenderán a plegarse en ella. Este hecho, conocido como la “degeneración entre el espacio de secuencias y el espacio de estructuras” conduce al concepto de “red neutral”.

Las redes neutrales son conjuntos de secuencias que se pliegan en la misma estructura, estando cada secuencia conectada con (como mínimo) otra secuencia a través de mutaciones puntuales neutrales (Schuster et al. 1994), tal como se ejemplifica en la Figura I9. Debido a la degeneración de los espacios de secuencia y estructura, la mayoría de estructuras poseen una extensa red neutral de secuencias (Hofacker et al. 1994). Como consecuencia, durante la evolución (en la naturaleza o *in vitro*) de poblaciones de RNA (o de ssDNA) pueden producirse mutaciones en las secuencias de las moléculas (su genotipo) sin que se altere su estructura secundaria y con ello la terciaria o eventualmente su función biológica (su fenotipo). De esta forma, la evolución de ácidos nucleicos ofrece alta resistencia por parte de las poblaciones frente a los cambios ambientales inducidos por las presiones selectivas y permite que secuencias con el mismo *fitness* puedan moverse a través de su red neutral sin verse afectadas funcionalmente (Manrubia and Cuesta 2010).

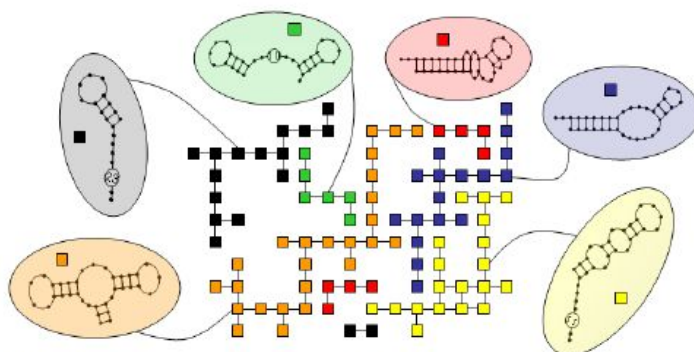


Figura I9. Representación esquemática del espacio de secuencias y estructuras y las redes neutrales que se forman. Los cuadros representan diferentes secuencias, las líneas que los unen serían mutaciones que permiten pasar de una a otra, y los colores reflejan las estructuras secundarias en que las secuencias se pliegan. El tamaño de cada red neutral viene definido por el número de secuencias diferentes que se pliegan en una misma estructura. El salto de una red a otra se produce cuando una única mutación genera un cambio estructural. Figura tomada de (Manrubia and Cuesta 2010).

En el ámbito de los aptámeros, durante los procesos selectivos y evolutivos las secuencias de ácidos nucleicos se irán moviendo a través de sus redes neutrales siempre que la presión selectiva no varíe de forma sustancial. Lógicamente, la probabilidad de “saltar” de una red neutral a otra es en principio proporcional a la tasa de mutación introducida durante la amplificación de la población, por lo que (como se comenta en otros apartados de este trabajo) la evolución *in vitro* sería un método teóricamente más eficiente que la selección *in vitro* para llegar a soluciones fenotípicas alternativas a partir de una misma población inicial. Sin embargo, durante el proceso evolutivo se pueden perder estructuras útiles para la unión al ligando debido a la continua presión mutacional introducida. En resumen, el trabajo con aptámeros supone un interesante campo para la interacción entre experimentación *in vitro* y simulación *in silico*.

1.7. APTÁMEROS ESPECÍFICOS FRENTE A PROTEÍNAS

Entre las moléculas que pueden ser utilizadas como dianas para seleccionar aptámeros, las proteínas resultan muy adecuadas desde el punto de vista químico, debido a que los diferentes grupos funcionales aportados por los aminoácidos (entre ellos aceptores y donadores de puentes de hidrógeno, anillos hidrofóbicos o grupos químicamente cargados al pH de trabajo) pueden participar en distintos tipos de interacciones no covalentes entre aptámero y proteína (Wilson and Szostak 1999). Además, las proteínas poseen superficies extensas que incluyen diversos motivos estructurales (como crestas, surcos, proyecciones, depresiones y bolsillos) reconocibles por los aptámeros que tengan la conformación adecuada. De hecho, uno de los dos artículos fundacionales de este campo, el que dio nombre al método SELEX, consistió en la selección *in vitro* de aptámeros de RNA contra una proteína: la DNA polimerasa del fago T4 (Tuerk and Gold, 1990). Si bien ésta es una proteína que naturalmente se une a DNA, dadas las características citadas, incluso las proteínas que naturalmente no interaccionan con ácidos nucleicos resultan atractivas para generar aptámeros contra ellas.

La primera selección de un aptámero contra una proteína que en la naturaleza no interacciona ni con RNA ni con DNA permitió obtener aptámeros de ssDNA para trombina, partiendo de una población combinatorial con $\sim 10^{13}$ secuencias de 60 nucleótidos variables flanqueados por regiones constantes (Bock et al. 1992). En este estudio se detectó, tras analizar 32 de las secuencias obtenidas una vez realizadas cinco rondas de selección, una región muy conservada de 14-17 nt (con secuencia 5'-GGNTGG(N₂₋₅)GGNTGG-3') que confería al aptámero una afinidad en el rango de 25-200 nanomolar (nM) contra trombina, pero no contra otras serín-proteasas. Posteriormente se realizaron ensayos con el "aptámero mínimo" anti-trombina (un oligonucleótido de 15 nt con secuencia 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'), que a una concentración de 25 nM inhibía la actividad de la trombina, consiguiendo así descender la tasa de coagulación de la sangre en un 50% (Griffin et al. 1993).

Desde entonces se han realizado numerosas selecciones de aptámeros frente a proteínas, algunos de los cuales poseen un elevado interés no solamente desde el punto de vista de investigación básica sino por su utilidad en biotecnología y biomedicina (Wilson and Szostak 1999, Klussmann 2006). Entre ellos, el aptámero de mayor repercusión, por ser el único comercializado para uso clínico hasta la fecha, es el generado contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una proteína transmembrana (de las células del endotelio vascular, como su nombre indica) que estimula vasculogénesis y angiogénesis (Bell et al. 1999). Llamado en sus inicios

NX1838, actualmente es más conocido como Pegaptanib® (o por su nombre comercial, Macugen). Tras finalizar los ensayos clínicos y ser aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2004, comenzó a comercializarse en enero de 2005 (Doggrell 2005). Se trata de un aptámero de RNA de 27 nt (más corto que el aptámero seleccionado inicialmente) modificado con 2'-fluoropirimidinas y 2'-O-metilpurinas para aumentar su estabilidad y resistencia a RNasas en fluidos biológicos. Además, su extremo 3' está modificado con desoxitimidina y el 5' incluye un grupo PEG (Ng et al. 2006). Este aptámero impide la unión de la isoforma VEGF₁₆₅ a sus ligandos de alta afinidad, actuando como antagonista de VEGF y, por tanto, inhibiendo la angiogénesis. Con ello, el primer fármaco de naturaleza aptamérica actúa contra la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE, o ARMD por las siglas en inglés de *Age-Related Macular Degeneration*), patología que provoca pérdida de visión por daño en la retina en personas de edad avanzada (Gold et al. 2012, Sundaram et al. 2013). Actualmente, son muchos los aptámeros que se encuentran en diferentes fases de ensayos clínicos para ser aprobados en el futuro como agentes terapéuticos (Tabla I2) (Kong and Byun 2013). Entre ellos podemos citar la molécula ARC1905, también activa contra la ARMD pero teniendo como diana el componente 5 del sistema de complemento (C5) (Khan et al. 2014), o el aptámero AS1411 cuya diana es la nucleolina y que se está ensayando contra la leucemia mieloide aguda (Rosenberg et al. 2014). Por tanto, en un futuro no muy lejano los aptámeros podrían constituir una nueva y muy útil herramienta terapéutica a disposición de enfermos con diferentes patologías.

1. INTRODUCCIÓN

Tabla I2. Listado de algunos de los aptámeros que se encuentran actualmente en distintas fases de ensayo para su aplicación clínica [revisado en (Kong and Byun 2013, Sundaram et al. 2013, Ishikawa et al. 2015)].

Nombre aptámero	Diana de unión	Patología	Fase de ensayo clínico*
Macugen	VEGF	ARMD	Aprobado (2004)
Macugen	VEGF	Edema macular diabético	Fase 3 finalizada
REG1 (RB006 y RB007)	Factor de coagulación IXa	Enfermedad de las arterias coronarias	Fase 3 finalizada
E10030	PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés <i>Platelet-derived growth factor</i>)	ARMD	Fase 3
AS1411	Nucleolina	Leucemia mieloide aguda	Fase 2 finalizada
ARC1779	Dominio A1 del factor Von Willebrand	Enfermedad de Von Willebrand	Fase 2 finalizada
NOX-E36	Quimiocina CCL2	Nefropatía diabética	Fase 2 finalizada
NOX-H94	Hepcidina	Anemia de enfermedades crónicas	Fase 2
NU172	Trombina	Enfermedad coronaria arterial	Fase 2
NOX-A12	Quimiocina CXCL12	Mieloma múltiple/Leucemia linfocítica crónica/Glioblastoma	Fase 2 (fase 1 en caso de glioblastoma)
ARC19499	TFPI (inhibidor de la ruta del factor tisular, del inglés <i>Tissue factor pathway inhibitor</i>)	Hemofilia	Fase 1 finalizada
ARC1905	Componente C5 del sistema de complemento	ARMD	Fase 1 finalizada
Zimura	Componente C5 del sistema de complemento	ARMD	Fase 2/3

* Información tomada de: <https://clinicaltrials.gov/>. Fecha de actualización: agosto 2016.

1.8. MÉTODOS PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN APTÁMERO-PROTEÍNA

En todos los procesos de obtención de aptámeros es necesario comprobar la afinidad y especificidad de éstos contra la diana de selección, para lo cual se han desarrollado diferentes métodos experimentales. Su objetivo general es determinar con precisión la afinidad de unión aptámero-diana al final de un determinado número de ciclos (o al finalizar cada ciclo, si se requiere un seguimiento continuo del proceso) mediante el cálculo del valor de la constante de disociación, K_d (*dissociation constant*), y/o la capacidad de unión máxima (B_{max}), estando ambos conceptos relacionados entre sí tal como se muestra en la Figura I10: la K_d es la concentración de aptámero a la que, en la disolución que los contiene, se encuentran ocupados el 50% de los sitios de unión del ligando ($B_{max}/2$) (Syrett et al. 2009).

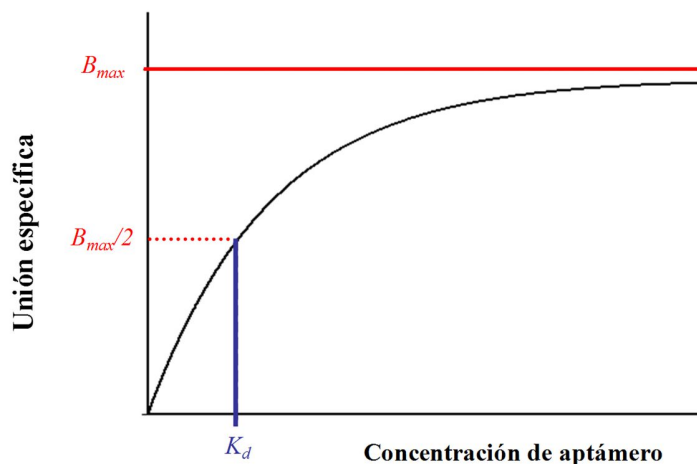


Figura I10. Un ejemplo de curva de saturación de la unión de un determinado ligando. Gracias a este tipo de curvas pueden calcularse los valores de la constante de disociación, K_d (en azul) y de la capacidad de unión máxima, B_{max} (señalada en rojo).

Estos parámetros pueden calcularse trabajando con el conjunto de la población resultante o bien utilizando aptámeros individuales obtenidos de ella. Así, los procesos de selección o evolución pueden darse por finalizados u optimizados cuando la capacidad de unión máxima B_{max} no aumenta significativamente entre un ciclo y el siguiente, lo que indica que ya se ha saturado el mayor número posible de sitios de unión. Si el parámetro cuantificado es la K_d , lo que se busca es un descenso de su valor (lo que implica mayor afinidad), pudiendo dar por finalizada la selección cuando K_d no se reduzca de forma significativa (Stoltenburg et al. 2007).

En general, las técnicas existentes para estudiar cualitativa y cuantitativamente la interacción de los aptámeros con sus dianas pueden dividirse en varios grupos, con diferentes características y aplicaciones (O'Sullivan 2002, Jing and Bowser 2011b, Cai and Huang 2012). Tres de los primeros sistemas utilizados fueron la diálisis, la ultrafiltración y la cromatografía (McKeague and Derosa 2012). Tanto la diálisis como la ultrafiltración se basan en la separación de dos compartimentos mediante una membrana que impide el paso de los complejos aptámero-proteína, pero sí permite el movimiento de los ácidos nucleicos no unidos a su diana (Jenison et al. 1994, Lorsch and Szostak 1994, Miyachi et al. 2009). Por su parte, las técnicas cromatográficas (entre las cuales la cromatografía de afinidad es la más utilizada en este campo) constan de una fase móvil y otra estacionaria de modo que los analitos (aptámeros o proteínas), en disolución en la fase móvil, interaccionan con la fase estacionaria (a la que se han unido la proteína diana o el aptámero, respectivamente) y son retenidos de forma selectiva (Geiger et al. 1996).

También han sido muy utilizadas las técnicas basadas en electroforesis. Entre ellas, en primer lugar se puede citar la denominada EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), que permite detectar la interacción de los aptámeros con sus proteínas diana por la reducción de la movilidad electroforética de los complejos aptámero-diana en geles de agarosa o poliacrilamida no desnaturizantes, empleando habitualmente aptámeros marcados radiactivamente (Wilson and Szostak 1999). Entre las ventajas de esta técnica están su rapidez, la sensibilidad para la detección de la interacción aptámero-proteína y su potencial para realizar un análisis cualitativo y cuantitativo (Cai and Huang 2012). Otro tipo de electroforesis muy útil para el análisis de la afinidad de los aptámeros por sus dianas lo constituye la electroforesis capilar (Jorgenson and Lukacs 1981), la cual (como se mencionó en el apartado 1.4.8) también se utiliza para realizar la fase de selección en la variante conocida como CE-SELEX. Su característica diferencial respecto al resto de electroforesis es que la separación de los complejos aptámero-diana y los aptámeros no unidos se realiza en un capilar de pequeño diámetro (20–100 micrómetros, μm) que permite la utilización de un volumen mucho menor de muestra, realizándose la separación a mayor velocidad y con mayor eficiencia (Mairal et al. 2008, Jing and Bowser 2011a).

La interacción aptámero-proteína también se puede caracterizar mediante una modificación del tradicional método conocido como *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) en la que se emplean aptámeros en lugar de anticuerpos. A esta variante se le dio el nombre de *Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay* (ELONA) y fue patentada en 1997 por la compañía entonces llamada NexStar (Drolet et al. 1996). En concreto, el trabajo de Drolet y sus colaboradores consistió en un ensayo en el que se inmovilizó un anticuerpo monoclonal específico para VEGF que fue incubado

con la proteína diana y con un aptámero de RNA desarrollado contra ella (modificado fluorescentemente). La unión se detectó mediante la adición de un anticuerpo anti-fluoresceína. El ELONA se puede realizar en distintos formatos como, por ejemplo, inmovilizando la proteína diana (o bien el aptámero) sobre un soporte sólido (como una placa multipocillo con la superficie convenientemente tratada) e incubando con los aptámeros seleccionados (o en su caso la proteína diana) marcados radiactivamente, o bien con biotina o con fluoróforos para permitir su posterior detección (Mok and Li 2008). El grupo de Kiel introdujo una variante de tipo sándwich que llamó ALISA (*Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay*) en la que emplearon los aptámeros como elementos tanto de captura como de detección (Vivekananda and Kiel 2006).

Otro ejemplo de una técnica desarrollada con anticuerpos y después adaptada al uso de aptámeros es la modificación del *western blot* o *immunoblot* cuya variante recibe el nombre de *aptamer blotting*, en la que los anticuerpos primario y secundario son sustituidos por aptámeros (Noma et al. 2005, Yoshida et al. 2009, Savory et al. 2010). Por tanto, y dada su versatilidad, los aptámeros pueden acoplarse a cualquier ensayo de los realizados con anticuerpos, sustituyéndolos o complementándose con éstos. Además, al tratarse de ácidos nucleicos, los aptámeros permiten un acoplamiento de las diferentes técnicas con la amplificación mediante PCR o RT-PCR a tiempo final, o bien PCR o RT-PCR cuantitativas a tiempo real (qPCR o RT-qPCR). En éstas últimas se calcula el llamado valor de Ct (del inglés *threshold cycle*), que corresponde al ciclo de amplificación a partir del cual la cantidad de producto amplificado sobrepasa el umbral correspondiente a la señal de fondo e inicia su crecimiento exponencial. Esto permite eliminar la necesidad de marcaje de los aptámeros (evitando así los problemas que dicho marcaje presenta) y reduce los límites de detección de los mismos, lo que conlleva un aumento de la sensibilidad de la técnica con la que se acoplen (Pinto et al. 2009, Pinto et al. 2014) como se ejemplifica en el presente trabajo.

1.9. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN APTÁMERO-PROTEÍNA

La microscopía de fuerza atómica (AFM), puesta a punto en 1986 (Binnig et al. 1986), es una técnica de base nanotecnológica que permite la visualización directa de moléculas a alta resolución (en el rango de los nanómetros). Mediante AFM es posible observar y analizar una gran variedad de muestras biológicas, entre las que se incluyen ácidos nucleicos (DNA y RNA), proteínas y complejos entre ambos tipos de biomoléculas (Fritz et al. 1997, García-Sacristán et al. 2014, Lyubchenko et al. 2014).

De forma resumida, la técnica de AFM consiste en obtener la topografía de una muestra gracias a la interacción de una sonda muy afilada (típicamente, con radios de curvatura entre 2 y 10 nm en su punta) acoplada a una micropalanca flexible que se flexiona de acuerdo al relieve de la superficie de la muestra (Figura I11). Así, el contacto entre la punta y la muestra provoca un cambio en el ángulo de la micropalanca, lo que a su vez induce una variación en el ángulo de reflexión de un láser que es registrado por un fotodetector (Whited and Park 2014).

La visualización de moléculas biológicas mediante AFM (tanto al aire como en disolución) requiere una preparación previa de las mismas y puede realizarse mediante diferentes aproximaciones. La inmovilización de las muestras sobre la superficie consiste en la deposición sobre el sustrato sólido elegido (típicamente, mica recién exfoliada) de una solución acuosa con la molécula o complejo molecular que se va a estudiar (El Kirat et al. 2005). En cuanto a la interacción producida entre la punta de AFM y la muestra, puede ser permanente mientras dure el escaneo de la muestra (modo de contacto o *contact mode*), o bien puede ser intermitente (modo de “golpeteo” o “repiqueo”, *tapping mode*) (Moreno-Herrero et al. 2004) (Figura I11). En ambos casos la presión ejercida por la punta sobre la muestra es equivalente, pero en el modo intermitente se hace oscilar la micropalanca, lo que evita el contacto permanente con la muestra y con ello el arrastre o deformación de las biomoléculas durante el estudio (Hansma and Hoh 1994, Allison et al. 2010).

Gracias a sus características y a su versatilidad, el AFM se ha convertido durante las últimas dos décadas en una importante herramienta para el estudio de biomoléculas individuales y en complejo, así como para el avance en el conocimiento de diferentes procesos biológicos y biotecnológicos a escala nanométrica (García-Sacristán et al. 2014, Geary et al. 2014, Whited and Park 2014).

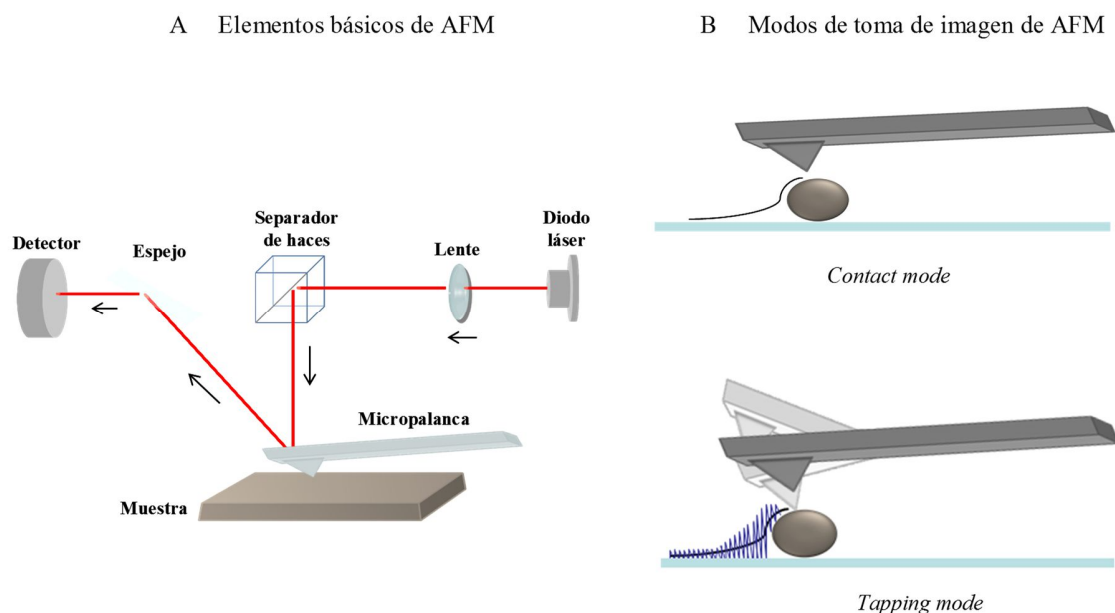


Figura I11. A) Esquema de los elementos básicos principales del microscopio de fuerza atómica (AFM). El ángulo con el que se refleja el láser sobre la micropalanca varía en función de la oscilación de ésta, lo que a su vez está condicionado por la topografía de la muestra. B) Esquemas de las principales alternativas de toma de imagen en AFM. En la parte superior se muestra una representación del modo de contacto permanente (*contact mode*), en el que la punta rastrea toda la muestra siguiendo líneas paralelas a lo largo de ella. En la parte inferior se muestra una representación del modo intermitente (*tapping mode*), en el que la punta no está en permanente interacción con la muestra gracias a la oscilación continua de la micropalanca.

1.10. APTASENORES

Los aptasensores son un tipo de biosensores en los que el elemento biológico de reconocimiento es un aptámero de DNA o de RNA. Así pues, se trata de dispositivos que llevan integrado uno o varios aptámeros, capaces de reconocer las dianas moleculares contra las que han sido previamente seleccionados *in vitro*, y generan una señal cuantitativa o semi-cuantitativa cuando se producen las interacciones específicas aptámero-ligando (O'Sullivan 2002, Song et al. 2012, Moreno 2015).

El primer estudio sobre la aplicación de aptámeros para su uso en biosensores fue llevado a cabo por Davis y sus colaboradores, quienes deseaban estudiar su utilidad como sondas en sistemas de citometría de flujo (Davis et al. 1996). Para ello, utilizaron aptámeros de DNA seleccionados contra la proteína HNE (*human neutrophil elastase*) marcados con fluoresceína para comprobar que la detección de dicha proteína (unida a nanopartículas) por parte del aptámero era tan eficaz como si

se empleaban anticuerpos anti-HNE. Otros de los primeros aptasensores desarrollados fueron los conocidos como *Aptamer Beacons*, también llamados *Aptabeacons* o *Molecular Beacons in Aptasensing* (MBA). La tecnología de MBA fue puesta a punto por Tyagi y Kramer (Tyagi and Kramer 1996), quienes definieron estos aptámeros como ácidos nucleicos capaces de sufrir un cambio conformacional inducido por la interacción con su diana, lo que se traducía en una señal medible y, por tanto, les permitía funcionar como sensores. Para ello, los *aptabeacons* se diseñan con una secuencia nucleotídica tal que, en ausencia de ligando, forma una estructura secundaria cerrada de tipo tallo-lazo. Además, en su extremo 5' portan un fluoróforo y en el 3' un *quencher* (molécula que inhibe o apantalla la fluorescencia), por lo que la estructura cerrada aproxima el fluoróforo y el *quencher* e impide la emisión de fluorescencia. Al unirse a la diana, el cambio conformacional generado en el *aptabeacon* aleja sus dos extremos y la fluorescencia deja de estar apantallada. A partir de este diseño inicial se han desarrollado con posterioridad nuevos métodos que permiten la detección de dicho cambio conformacional (y, por consiguiente, la unión entre aptámero y diana) mediante transferencia de energía entre fluorocromos (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) (Henry et al. 1999, Vicens et al. 2005) o mediante técnicas electroquímicas (Fan et al. 2003, Radi et al. 2006, Mir et al. 2008, Moreno et al. 2011b).

Las aproximaciones electroquímicas también se han probado con aptámeros que no están en formato *aptabeacon* debido a que la transducción electroquímica ofrece una respuesta rápida y de alta sensibilidad, siendo además una técnica con bajo coste de producción y con posibilidad de miniaturización (Mairal et al. 2008, Hayat and Marty 2014). En uno de los primeros aptasensores electroquímicos desarrollados se utilizaron dos aptámeros en formato sándwich que reconocían diferentes zonas de la trombina, generando una corriente eléctrica en presencia de ésta (Ikebukuro et al. 2005). Para ello, uno de los aptámeros se inmovilizó sobre un electrodo de oro y el otro se marcó con pirroloquinolina quinona unida a glucosa deshidrogenasa: tras la unión de la trombina a ambos aptámeros (en presencia de glucosa) se generaba una corriente eléctrica medible cuya intensidad era proporcional a la concentración de trombina añadida. También se han puesto a punto aptasensores electroquímicos en los que intervienen nanopartículas, por ejemplo, de platino (Pt-NPs) que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno a agua (Polsky et al. 2006), o nanopartículas de oro (Au-NPs) que pueden conjugarse con proteínas o con enzimas como la peroxidasa de rábano (Moreno et al. 2011b).

El uso de Au-NPs en aptasensores ofrece varias ventajas derivadas de sus propiedades físicas y químicas, como el hecho de ser fototérmicas y presentar propiedades ópticas, así como por poder ser funcionalizadas con un amplio abanico de grupos químicos. En un ejemplo, se

desarrollaron biosensores de ATP y cocaína basados en aptámeros a los que se unieron secuencias *linker* y fueron funcionalizados con otras secuencias complementarias a los extremos 5' o al 3' del *linker* unido a las partículas de oro. Con ello, en ausencia de ligando se produce agregación de las nanopartículas como consecuencia de la unión entre el *linker* y el aptámero con los oligonucleótidos complementarios, lo que produce un color morado. Sin embargo, en presencia del ligando (ATP o cocaína) los aptámeros se separan de las secuencias complementarias para plegarse y unirse a la diana, mientras que el *linker* permanece unido a su oligonucleótido complementario. Esto provoca la separación de los agregados de nanopartículas de oro y como consecuencia el cambio de color a rojo (Elghanian et al. 1997, Liu and Lu 2005).

Otro tipo de aptasensores son los *microarrays* de aptámeros o *aptarrays* (Bock et al. 2004, Collett et al. 2005a, Collett et al. 2005b), que se obtienen inmovilizando sobre un soporte sólido aptámeros individuales en diferentes puntos con dimensiones micrométricas, siguiendo una disposición previamente definida. Sobre este *array* de sondas se une la proteína diana marcada fluorescentemente o con biotina (ensayo directo), o bien se une la proteína sin marcar y a continuación se añade un segundo aptámero marcado (ensayos de tipo sándwich). Con ello, los *aptarrays* permiten identificar los aptámeros con mayor afinidad por la diana de forma rápida y sencilla, en un formato que ofrece gran capacidad de multiplexado (Syrett et al. 2009).

1.11. EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA (*FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS*, FMDV)

1.11.1. Biología del FMDV

El virus de la fiebre aftosa (*foot-and-mouth disease virus*, FMDV, Figura I12) es la especie prototipo del género *Aphthovirus*, dentro de la familia *Picornaviridae*. Es el agente etiológico de la enfermedad vesicular aguda y sistémica altamente contagiosa conocida como fiebre aftosa o glosopeda (Loeffler and Frosch 1897). Esta patología fue descrita por primera vez en 1514 por Hieronymus Fracastorius en Venecia, indicando que los animales afectados rechazaban la comida y mostraban vesículas (también conocidas como “aftas”) tanto en la cavidad oral como en las pezuñas (Fracastorius 1546, Pereira 1981). De hecho, el FMDV infecta principalmente al ganado bovino, ovino, caprino y porcino, aunque se ha aislado en más de 70 especies diferentes de mamíferos, incluido en humanos (Fajardo et al. 2012, Jamal and Belsham 2013).

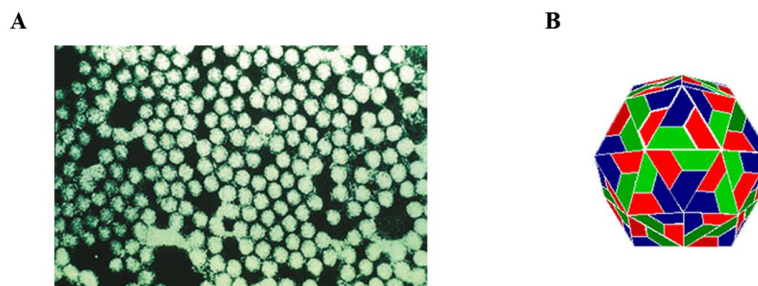


Figura I12. A) Imagen de virus de la fiebre aftosa (FMDV) obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (imagen de dominio público cortesía de Wikipedia y FBI). B) Esquema de la estructura de la cápside de FMDV. Los colores representan las proteínas VP1 (azul), VP2 (verde) y VP3 (rojo) que quedan expuestas en la superficie. La proteína VP4, al quedar en el lado interior, no está representada (imágenes de la Universidad de Saint Andrews, Escocia, <http://biology.st-andrews.ac.uk/newsItem.aspx?ni=1473>).

Este virus posee una cápside proteica con simetría icosaédrica (Figura I12) y aproximadamente 30 nm de diámetro, carece de envoltura lipídica y su material genético es una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, (+)ssRNA, de entre 8083 nt y 8287 nt en función del aislado y del serotipo concreto (Carrillo et al. 2005), que actúa como mRNA en el interior de la célula infectada (Bachrach 1977).

La especie FMDV está dividida en siete serotipos: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1 (Longjam et al. 2011). Los primeros en describirse fueron el O y el A y se nombraron por una letra que indicaba sus respectivos orígenes: O por el departamento francés de Oise y A por Alemania. Poco después se detectó el serotipo C (Vallée 1922, Waldmann 1926). Por su parte, los serotipos SAT-1, SAT-2 y SAT-3 se encontraron en muestras procedentes del sur de África (*South Africa Territories*), mientras que el Asia-1 fue originalmente detectado en dicho continente, concretamente en Pakistán (Brooksby 1957, Brooksby 1958). Del origen de los distintos serotipos se deduce que este virus afecta a numerosos países de varios continentes, si bien en el mundo desarrollado (salvo brotes como el producido en Reino Unido en 2001) se considera erradicado. Esto se debe a las medidas tomadas para evitar su expansión mediante diferentes sistemas de diagnóstico (que permiten discriminar hasta nivel de serotipo), de vacunación, así como de sacrificio de animales infectados y de otros potencialmente contagiados (Jamal and Belsham 2013).

La principal vía de entrada del FMDV en sus hospedadores es a través del tracto respiratorio y, es tal su infectividad, que la interiorización de entre una y diez partículas virales infecciosas puede ser suficiente para producir la enfermedad (Sellers 1971, Donaldson et al. 1987, Sobrino et al. 2001). Una vez en el organismo, su entrada en las células diana se lleva a cabo por un primer reconocimiento de proteínas integrales de membrana (concretamente $\alpha\text{v}\beta_3$, un receptor de la

familia de las integrinas) por una secuencia Arg-Gly-Asp presente en el *loop* flexible β G- β H de la proteína VP1 de la cápside viral (Fox et al. 1989, Neff et al. 1998). Cuando el virus consigue entrar en la célula mediante endocitosis, la acidificación de los endosomas desencadena la disociación de las cápsides, liberando así el RNA genómico viral en el citoplasma celular. A continuación, el (+)ssRNA genómico viral ha de ser traducido por los ribosomas y el resto de la maquinaria de traducción celular. El genoma de FMDV codifica una sola poliproteína que será escindida por proteasas virales dando lugar a diferentes proteínas (ver más adelante). La región que codifica dicha poliproteína se encuentra flanqueada por extremos 5' y 3' no traducidos (*untranslated regions*, UTR) (Figura I13). El extremo 5'-UTR es una larga región (de unos 1300 nt) de RNA altamente estructurado que incluye distintos codones de iniciación AUG (Poyry et al. 1992) y elementos de estructura tales como el fragmento S, la región poliC, el elemento *cre* (*cis-acting replication element*) y el elemento IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (Belsham 2005). El elemento IRES (que se describirá en el apartado 1.11.2) es esencial para el inicio de la traducción de la poliproteína viral, dado que los picornavirus carecen de m⁷G *cap* y en su lugar poseen una pequeña proteína (de 24 o 25 aminoácidos), VPg, unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico, que es escindida en el citoplasma poco después de la entrada del virus en la célula (Ambros et al. 1978, Ambros and Baltimore 1980). Como consecuencia, el inicio de la traducción se realiza a través de un mecanismo independiente de *cap* y dirigido por el IRES en el que participan diferentes proteínas de la célula hospedadora (Jang et al. 1988, Pelletier and Sonenberg 1988, Fitzgerald and Semler 2009). Por su parte, el extremo 3'-UTR del genoma de FMDV es una región corta (alrededor de 90 nt) con una cola poli(A) de longitud variable (Dorsch-Hasler et al. 1975) que estimula la actividad del IRES y participa en la replicación viral (Fajardo et al. 2012, Martinez-Salas et al. 2015).

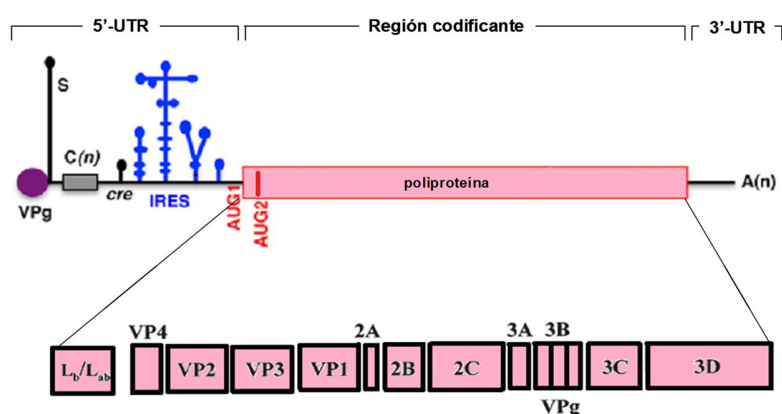


Figura I13. Representación esquemática del genoma de FMDV y de las proteínas maduras codificadas desde la poliproteína. Modificado de (Sobrinho et al. 2001, Fajardo et al. 2012).

Tras la traducción de la región codificante (Figura I13), la poliproteína viral se procesa en cuatro productos primarios (L, P1-2A, P2 y P3) que dan lugar a diferentes proteínas. La región L origina dos proteínas, Lab y Lb, que catalizan su escisión proteolítica de la poliproteína. Por su parte, la región P1-2A origina las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4 (también llamadas 1D, 1B, 1C y 1A, respectivamente) que forman la cápside. Estas cuatro proteínas se asocian formando protómeros en los que VP1-VP3 quedan orientadas hacia el exterior, mientras que VP4 se orienta hacia el interior de la cápside. Los protómeros se unen de 5 en 5 formando pentámeros, 12 de los cuales interaccionan para dar lugar a una cápside icosaédrica completa como la mostrada en la Figura I12 [revisado en (Sobrino et al. 2001, Jamal and Belsham 2013)]. Por último, las regiones P2 y P3 codifican diferentes proteínas no estructurales: P2 origina las proteínas 2A, 2B y 2C, mientras que la región P3 da lugar a 3A, 3B₁₋₃ (tres copias diferentes en tándem de VPg), 3C y 3D, siendo ésta última la RNA polimerasa-RNA dependiente viral.

1.11.2. El elemento IRES de FMDV

Los elementos IRES son regiones altamente estructuradas del RNA localizados en los extremos 5'-UTR de RNAs genómicos virales o mRNAs celulares (Kowalinski et al. 2007). La estructura altamente conservada de los elementos IRES permite la unión a ellos de la subunidad 40S del ribosoma y de los factores de iniciación (eIFs), desencadenando el comienzo de la traducción independiente de *cap*. Este mecanismo de inicio de la traducción es esencial no solamente para los virus de la familia *Picornaviridae* [en los cuales se identificaron por primera vez los elementos IRES (Jang et al. 1988, Pelletier and Sonenberg 1988)], sino también para los de las familias *Flaviviridae* y *Dicistroviridae* (Hellen and Sarnow 2001). Además, se estima que hasta el 10% de los mRNAs celulares pueden contener este tipo de elementos estructurales/funcionales (Stoneley and Willis 2004). Los elementos IRES se dividen en cuatro grupos en función de su estructura y de la cantidad de proteínas del hospedador con las que interaccionan. Entre ellos, los IRES de los géneros *Aphthovirus* (al que pertenece FMDV) y *Cardiovirus* (como el virus de la encefalomiocarditis, EMCV) de la familia *Picornaviridae* se encuadran en el tipo II (Fitzgerald and Semler 2009, Burks et al. 2011). En el grupo I se incluyen los IRES de los géneros *Enterovirus* (como los virus de la polio) y *Rhinovirus* (como el virus del resfriado común) de esa misma familia, mientras que en el tipo III se clasifican los del género *Hepacivirus* (como el virus de la hepatitis C, VHC), dentro de la familia *Flaviviridae* (Pisarev et al. 2004, Chard et al. 2006). Por último, en el grupo IV se encuentran el IRES de *Sapelovirus* y del enterovirus porcino PEV-8, cuyos IRES se encuadran como “similares a VHC” (Fitzgerald and Semler 2009, Burks et al. 2011).

El inicio de la traducción independiente de *cap* a partir de los elementos IRES requiere tanto de un conjunto de eIFs canónicos como de una serie de factores específicos, conocidos éstos últimos como ITAFs (*IRES Trans-Acting Factors*) (Pilipenko et al. 2000). Los ITAFs son en general proteínas celulares de unión a RNA que se reclutan específicamente por los IRES de los virus y se cree que ayudan en el plegamiento de su estructura activa (Hellen and Sarnow 2001, Stoneley and Willis 2004).

El IRES de FMDV posee 462 nt y se divide en cinco dominios estructurales, nombrados del 1 al 5 en dirección 5'-3' (Figura I14), siendo todos ellos necesarios para el inicio de la traducción (Fernandez-Miragall et al. 2009, Serrano et al. 2009, Pacheco and Martinez-Salas 2010, Martinez-Salas et al. 2015). El dominio 1 incluye los 21 primeros nucleótidos del IRES, formando parte del elemento *cre* de FMDV, por lo que en muchas ocasiones no se representa como parte del IRES (Mason et al. 2002, Lozano et al. 2015). El dominio 2, de 64 nt de longitud, incluye una región de polipirimidina (UCUUU) que proporciona un sitio de unión para la proteína PTB (proteína de unión al tracto de polipirimidina, del inglés *Polypyrimidine Tract-Binding*) (Lozano et al. 2015). El dominio 3, el más largo, consta de 214 nt que se organizan en dos regiones diferenciadas, apical y proximal. La zona apical forma una estructura cruciforme con dos bucles conservados filogenéticamente que contienen motivos esenciales para interacciones RNA-RNA (Lopez de Quinto and Martinez-Salas 1997, Robertson et al. 1999, Fernandez et al. 2011, Fajardo et al. 2012). Por su parte, la zona basal del dominio 3 está formada por un largo tallo interrumpido por bucles (Fernandez-Miragall and Martinez-Salas 2003, Fajardo et al. 2012). A este dominio es al que se une la proteína ITAF45 o Ebp1 (ErbB3 binding protein-1), de la que se hablará en el apartado siguiente (Pacheco et al. 2008) y que constituye la diana contra la que se han desarrollado aptámeros en este trabajo. El dominio 4, de 115 nt, está organizado en dos regiones tallo-lazo con burbujas internas ricas en adenina que están conservadas entre FMDV y EMCV (Yu et al. 2011). Este dominio es el responsable de la interacción con el factor de iniciación de traducción eIF4G (Lopez de Quinto and Martinez-Salas 2000, Pilipenko et al. 2000). Por último el dominio 5, de 45 nt, está compuesto por una región tallo-lazo conservada y otra rica en polipirimidinas que precede al primer codón AUG funcional. Este último dominio del IRES posee capacidad de interaccionar con la proteína Gemin 5 así como eIF4B (Martinez-Salas 2008, Fajardo et al. 2012, Martinez-Salas et al. 2015).

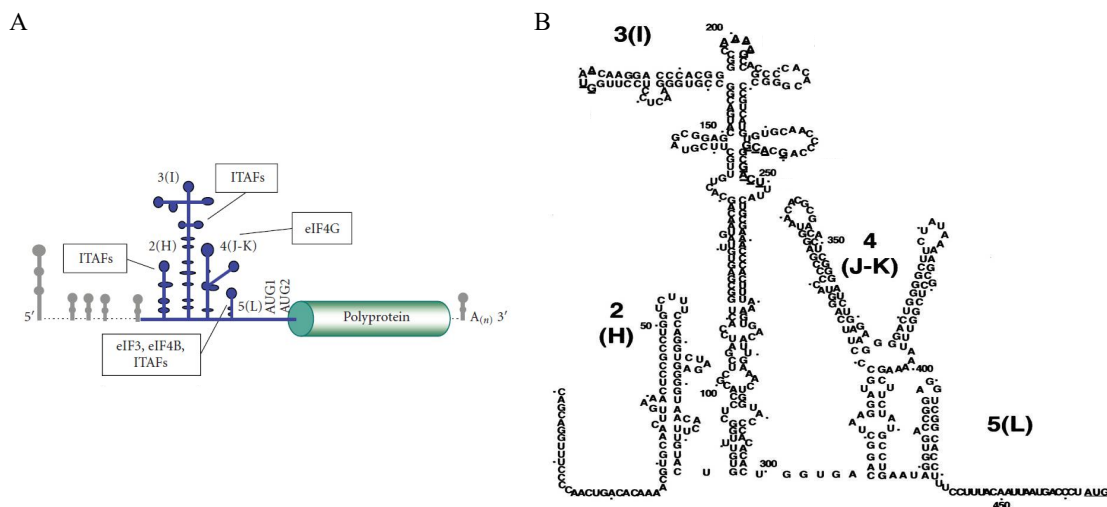


Figura I14. A) Representación esquemática del genoma de FMDV mostrando en azul el elemento IRES y señalando tanto los dominios del IRES como los sitios de unión de eIFs e ITAFs [tomada de (Pacheco and Martinez-Salas 2010)]. B) Representación de la estructura secundaria del IRES de FMDV. Se indican los diferentes dominios sin incluir el 1 ya que solapa con el elemento *cre* del genoma [modificado de (Fernandez-Miragall et al. 2006)].

1.12. PROTEÍNA EBP1 Y SU INTERACCIÓN CON EL ELEMENTO IRES DE FMDV

La proteína Ebp1 (ErbB3 binding protein-1) (Figura I15) se denomina así por su capacidad para interaccionar con el dominio citoplasmático del receptor ErbB3 (Yoo et al. 2000). Fue inicialmente identificada como el producto codificado por el gen humano *PA2G4* (*Proliferation-Associated 2G4*), que es miembro de una familia génica que incluye proteínas reguladoras de proliferación (Radomski and Jost 1995, Lamartine et al. 1997). En el año 2000 esta proteína también se identificó como un factor ITAF, otorgándole el nombre de ITAF45 debido a su peso molecular aparente (Pilipenko et al. 2000, Flather and Semler 2015).

La proteína Ebp1 humana es homóloga de una proteína de ratón (*Mus musculus*) identificada previamente, denominada p38-2G4, que se une a DNA y está regulada por el ciclo celular. No obstante, la región N-terminal de Ebp1 humana es más larga que la de ratón (Radomski and Jost 1995, Lamartine et al. 1997, Yoo et al. 2000). Posteriormente se ha comprobado que Ebp1 es una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución de los animales, y se han encontrado más de 30 genes que codifican proteínas homólogas en organismos que incluyen desde *Danio rerio* (pez cebra) a *Pan troglodytes* (chimpancé) (Maglott et al. 2005).

Ebp1 es una proteína de 394 aminoácidos (Figura I15) y masa molecular de 45 kDa, que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos (incluyendo hígado, corazón, cerebro, placenta, pulmón, músculo, páncreas, riñón, próstata y mama) y tipos celulares estudiados (Lamartine et al. 1997, Zhang et al. 2008). Existen dos isoformas de la proteína: p48, que se localiza en el citoplasma y nucleolo y que suprime la apoptosis pero promueve la diferenciación celular, y p42, que carece de 54 aminoácidos del extremo N-terminal presentes en p48 y está localizada predominantemente en el citoplasma, donde actúa para promover la diferenciación y suprimir la proliferación celular (Lessor and Hamburger 2001, Liu et al. 2006).

En cuanto a sus funciones, además de su implicación en el inicio de la traducción independiente de *cap* como factor ITAF, las actividades de la proteína Ebp1 en el organismo son muy variadas, estando relacionadas con el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Monie et al. 2007). Así, Ebp1 puede interactuar con ribosomas 80S y polisomas (Kowalinski et al. 2007), se relaciona con el procesamiento intermedio y tardío del rRNA (Squatrito et al. 2004) y en el citoplasma se asocia con la subunidad 40S de los ribosomas maduros, lo que sugiere que puede estar también involucrada en la traducción proteica dependiente de *cap* (Zhang et al. 2008).

Por otra parte, debido a su unión al receptor ErbB3, contribuye a la transducción de señales reguladoras de crecimiento mediadas por este receptor. Para la interacción con ErbB3, la proteína Ebp1 debe estar fosforilada en el aminoácido Ser360 (Lessor and Hamburger 2001, Liu et al. 2006), una fosforilación que también es necesaria para suprimir la apoptosis gracias a una interacción con la AKT quinasa (Monie et al. 2007). Sin embargo, el receptor ErbB3 debe estar en forma no fosforilada para que Ebp1 pueda interactuar con él (Yoo et al. 2000). Además, Ebp1 también interactúa con ssDNA y dsDNA, siendo un importante regulador de la transcripción: inhibe la transcripción de genes como E2F1, Ciclina D1 y Ciclina E, lo que se debe en parte a su interacción con correpresores transcripcionales como Sin3A, Rb (retinoblastoma) y HDAC2 (histone deacetylase 2) en promotores E2F1 (Zhang and Hamburger 2004, Zhang et al. 2008).

Como se ha adelantado, resulta de especial interés el hecho de que Ebp1 interactúa con el dominio 3 del IRES de FMDV y, lo que es más, que esta interacción es imprescindible para estimular el inicio de la traducción independiente de *cap* de la poliproteína viral (Pilipenko et al. 2000, Pacheco et al. 2008). Además, Ebp1 es incapaz de unirse al IRES de FMDV si se utilizan mutantes carentes de una secuencia localizada en el extremo C-terminal y rica en lisina (364-RKTQKKKKK-373). Esta secuencia es un motivo de unión para RNA que parece estar relativamente desestructurado en ausencia de ligando (Monie et al. 2007). Sin embargo, la unión a

1. INTRODUCCIÓN

IRES por parte de Ebp1 parece estar más relacionada con la estructura de la proteína que con su secuencia.

Por tanto, Ebp1 puede interaccionar con diferentes proteínas, DNAs y RNAs. Entre estos últimos destaca su unión a rRNAs (Squatrino et al. 2004), a complejos ribonucleoproteicos (Pilipenko et al. 2000, Squatrino et al. 2004, Bose et al. 2006, Squatrino et al. 2006) y también a mRNAs (Pilipenko et al. 2000, Squatrino et al. 2004, Bose et al. 2006, Squatrino et al. 2006). Por todo lo indicado, y en particular por su capacidad de unión tanto a RNA como a DNA, la proteína Ebp1 resulta una diana de gran interés para desarrollar aptámeros contra ella, lo que constituye el objetivo principal del presente trabajo.

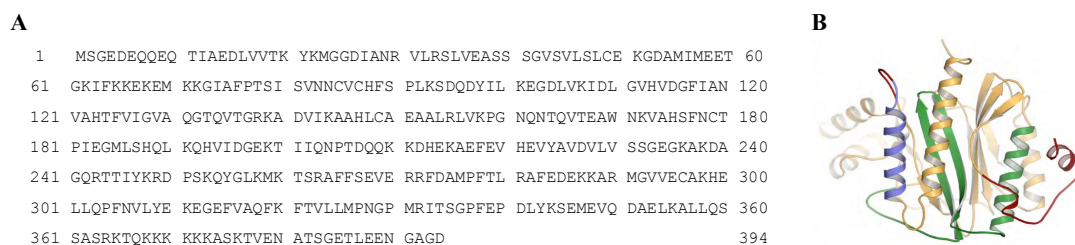


Figura I15. A) Secuencia aminoacídica de la proteína Ebp1 de ratón (*Mus musculus*), utilizada en el presente trabajo. B) Estructura obtenida por difracción de rayos X de Ebp1 de *Mus musculus* (Monie et al. 2007), con resolución de 2,5 Å.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La obtención de aptámeros de RNA y de DNA mediante selección o evolución *in vitro* es un campo de investigación en continuo desarrollo. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios sistemáticos que comparen el proceso de producción de aptámeros mediante selección *in vitro* frente a evolución *in vitro*, y en ambos casos de DNA frente a RNA, en los que se analice para cada ronda el repertorio molecular generado. Además, dicho repertorio de moléculas de ácido nucleico se debe estudiar tanto a nivel de secuencia (genotipo) como de estructura secundaria (primera aproximación al fenotipo), empleando, respectivamente, secuenciación molecular y algoritmos de plegamiento *in silico* de las secuencias. Por ello, los principales objetivos de este trabajo son los siguientes:

- **Objetivo 1:** Obtención de aptámeros de DNA específicos contra la proteína Ebp1, mediante selección y evolución *in vitro*.

- **Objetivo 2:** Obtención de aptámeros de RNA específicos contra la proteína Ebp1, mediante selección y evolución *in vitro*.

- **Objetivo 3:** Estudio comparativo (en secuencia y estructura secundaria) de los aptámeros obtenidos en los procesos de selección y evolución *in vitro*, así como de los aptámeros de DNA con respecto a los de RNA.

- **Objetivo 4:** Determinación de la afinidad y especificidad de los aptámeros de DNA y de RNA obtenidos por selección y evolución *in vitro* frente a la proteína Ebp1.

- **Objetivo 5:** Análisis preliminar de la estructura tridimensional nativa del elemento IRES de FMDV, de la proteína Ebp1 y de complejos IRES-Ebp1 mediante microscopía de fuerza atómica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Reactivos químicos generales y material de laboratorio

3.1.1.1. Reactivos (por orden alfabético).

- 2-propanol (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, EE.UU.).
- 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).
- Acetato de amonio 5 M (Ambion, Foster City, California, EE.UU.).
- Acetato de sodio 3 M, pH 5,5 (Ambion, Foster City, California, EE.UU.).
- Acrilamida:bisacrilamida en proporción 19:1 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU.).
- Agarosa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).
- Ampicilina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).
- Cloruro de magnesio (Ambion, Foster City, California, EE.UU.).
- Cloruro de manganeso (Ambion, Foster City, California, EE.UU.).
- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).
- Etanol absoluto (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, EE.UU.).
- Etanol 96% (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, EE.UU.).
- GelStar (Lonza, Basel, Suiza).
- Glicerol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).
- HEPES 1M, pH 7,2-7,5 (Gibco, Carlsbad, California, EE.UU.).
- H₂O DEPC (dietilpirocarbonato) (Ambion, Foster City, California, EE.UU.).
- H₂O milli-Q (Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.).
- Marcador de Peso Molecular de DNA de 1 kb (*1 kb DNA Ladder*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).
- Marcador de Peso Molecular de DNA de 50 pares de bases, pb (*DNA Step Ladder, 50 bp*) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).

- Marcador de Peso Molecular de RNA (*Low Range ssRNA Ladder*) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.).
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU.).
- Persulfato de amonio (APS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).
- Resina sefarosa Ni²⁺ - ácido nitriloacético (*Ni-NTA agarose*) (Qiagen GmbH, Frankfurt, Alemania).
- Tampón fosfato salino 10X (PBS 10X) pH 7,4 (Ambion, Foster City, California, EE.UU.). Utilizado como PBS 1X: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM.
- Tampón de selección (TS): NaCl 100 mM, MgCl₂ 6 mM, HEPES 100 mM pH 7,4.
- Tampón Tris-Ácido acético-Ácido etilendiaminotetraacético 10X (TAE 10X): Tris 400 mM, ácido acético 200 mM, EDTA 10 mM (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).
- Tampón Tris-Ácido bórico-Ácido etilendiaminotetraacético 10X (TBE 10X): Tris 1 M, ácido bórico 0,9 M, EDTA 0,01 M (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).
- Urea (Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

3.1.1.2. Material de laboratorio (por orden alfabético).

- Cubetas de electroforesis Sub-Cell GT para electroforesis de agarosa (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU. / Cmb, Cultek, Madrid, España).
- Placas de 96 pocillos para PCR y RT-PCR a tiempo final (Cmb, Cultek, Madrid, España).
- Placas de 96 pocillos para qPCR y RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU. / Cmb, Cultek, Madrid, España).
- Placas de poliestireno de 96 pocillos NUNC-MAxisorp para ELONA acoplado a (q)PCR o RT-(q)PCR (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).
- Placas de polipropileno de 96 pocillos para la conservación de las células transformadas en glicerol a -80°C (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).
- Placas de polipropileno de 96 pocillos profundos (2 ml/pocillo), para subcultivo de colonias transformadas (VWR International, Radnor, Pennsylvania, EE.UU.).

- Precintos de aluminio para placas de 96 pocillos (Costar, Corning Incorporated, Corning, Nueva York, EE.UU.).
- Precintos microporosos para placas de 96 pocillos (Qiagen GmbH, Frankfurt, Alemania).
- Precintos ópticos Microseal B para placas de qPCR y RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU.).
- Precintos plásticos transparentes para placas de 96 pocillos (3M Corporate, Maplewood, Minnesota, EE.UU.).
- Sistema Mini PROTEAN para electroforesis de geles de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU.).

3.1.2. Oligonucleótidos

El diseño de la población aleatorizada inicial (denominada “M1-40”), de DNA de cadena sencilla (ssDNA) y 76 nucleótidos (nt) de longitud, fue el siguiente:

5'-GCGGATCCAGACTGGTGT(N₄₀)GAAGCTTGTCTTTAGGGC-3',

donde (N₄₀) indica la región central de secuencia aleatoria de 40 nt de longitud, y las secuencias constantes en los extremos 5' y 3' (de 18 nt cada una) corresponden a las zonas de unión de los oligonucleótidos cebadores durante los procesos de amplificación. La secuencia de ambos extremos se diseñó en base a secuencias previamente utilizadas en el laboratorio, de forma que no originasen estructuras secundarias ni apareasen parcialmente entre ellas (Moreno et al. 2003, Hall et al. 2009, Ramos et al. 2010). Tanto este oligonucleótido M1-40 como el resto de oligonucleótidos utilizados a lo largo del presente trabajo (Tabla M1) fueron suministrados por IBA (Göttingen, Alemania) purificados por cromatografía líquida (HPLC) y liofilizados.

Tabla M1. Oligonucleótidos de DNA utilizados a lo largo de este trabajo.

Nombre (orientación)	Secuencia (5' – 3')	Longitud (nt)	Notas
M1-40	GCGGATCCAGACTGGTGT(N ₄₀)GAAGCTTGTCTTTAGGGC	76	
M1-F (F)	GCGGATCCAGACTGGTGT	18	
M2-F (F)	<u>TGTAATACGACTCACTATAGGGG</u> GCGGATCCAGACTGGTGT	40	[1]
M1-R (R)	GAAGCTTGTCTTTAGGGC	18	[2]
1b NS2 T724 (F)	GGGAGTATGTCGTGTTGCTT	20	
1b NS2 3087 (R)	AGCGCGTACGAAGTACGGCA	20	
M13-F (F)	GTAAAACGACGGCCAG	16	
M13-R (R)	CAGGAAACAGCTATGAC	17	

[1]: La secuencia subrayada corresponde al promotor de la T7 RNA polimerasa.

[2]: Este oligonucleótido también se utilizó modificado en 5' con un grupo fosfato.

3.1.3. Enzimas y kits para amplificación de ácidos nucleicos

- “*KAPA Taq DNA polymerase with dNTPs*” para amplificación inicial de la población por PCR estándar y para PCR asimétrica (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, EE.UU.).

- “*Expand High Fidelity PCR system*” para amplificación por PCR de alta fidelidad y para amplificación por PCR mutagénica (Roche, Mannheim, Alemania).

- “*KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X)*” para amplificación por PCR cuantitativa (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, EE.UU.).

- “*AmpliScribe T7 High Yield Transcription*” para transcripción *in vitro* (Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

- “*SuperScript III Reverse Transcriptase*” para transcripción reversa (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

- “*SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase*” para amplificación por RT-PCR en un solo paso (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

- “*SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit*” para amplificación por RT-qPCR en un solo paso (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

- “*Lambda exonuclease*” para digestión de DNA de cadena doble y obtención de DNA de cadena sencilla (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.).

3.1.4. Medios de cultivo y kits de clonaje en *E. coli*

- Medio líquido S.O.C. Compuesto por: triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

- Medio líquido TB (Terrific Broth). Compuesto por: triptona 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, K₂HPO₄ 9,4 g/l y KH₂PO₄ 2,2 g/l (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.). Para prepararlo ha de añadirse también glicerol a una concentración final de 8 ml/l.

- Medio sólido LB (Luria-Bertani) agar. Compuesto por: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l y agar 10 g/l (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.).

- Kit de ligación para clonaje “TOPO TA cloning PCR II” (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

- Células “One Shot Mach1-T1” de *E. coli* químicamente competentes (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

- X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) 50 mg/ml en N, N-Dimetilformamida (DMF) (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

3.1.5. Kits de extracción y secuenciación de DNA

- Kit “QIAprep Miniprep” para extracción de DNA plasmídico (miniprep) manual (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

- Kit de minipreps “Perfectprep Plasmid 96 Vac Base Kit” (5 Prime, Hamburgo, Alemania).

- Kit de secuenciación de DNA “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems Inc., Foster City, California, EE.UU.).

3.1.6. Equipos

- Centrífugas Eppendorf 5415D y 5415 R (Eppendorf GmbH, Hamburgo, Alemania).

- Centrífuga Eppendorf 5810 R (Eppendorf GmbH, Hamburgo, Alemania).

- Espectrofotómetros Nanodrop 1000 y 8000, de uno y ocho canales, respectivamente (Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

- Fuente de alimentación para electroforesis Bio-Rad PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU.).

- Microscopio de fuerza atómica (AFM) PicoSPM (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.).
- Estación automática de pipeteo para minipreps EpMotion 5075Vac (Eppendorf GmbH, Hamburgo, Alemania).
- Secuenciador ABI 3730xl DNA Analyzer de 48 capilares (Applied Biosystems Inc., Foster City, California, EE.UU.).
- Termobloques Thermomixer comfort (Eppendorf GmbH, Hamburgo, Alemania).
- Termociclador Veriti para PCR y RT-PCR a tiempo final (Applied Biosystems Inc., Foster City, California, EE.UU.).
- Termociclador iCycler iQ para qPCR y RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU.).

3.1.7. Software informático

- Bio-Rad iQ5 Standard Edition 2.0 (<http://www.bio-rad.com/es-es/category/amplification-software>).
- Chromas Lite 2.1 (<http://www.technelysium.com.au>).
- ClustalW 1.83 (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/dos/clustalw>).
- GelAnalyzer 2010a (www.gelanalyzer.com).
- GeneDoc 2.7 (<http://www.nrbsc.org>).
- GraphPad Prism 6.01 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).
- Image-J 1.48v (<http://imagej.nih.gov>) (Abramoff et al. 2004).
- mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/>).
- NanoDrop 1000 3.8.1 (<http://www.nanodrop.com>).
- NanoDrop 8000 2.2.1 (<http://www.nanodrop.com>).
- RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).
- Seqman (paquete DNASTAR Lasergene 8; <http://www.dnastar.com>).
- WSxM 3.1 (Nanotec, Madrid, España; <http://www.nanotec.es>) (Horcas et al. 2007).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Programas de amplificación de DNA por PCR a tiempo final y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Los diferentes programas de PCR a tiempo final y qPCR utilizados durante el trabajo, indicando las etapas, temperaturas y tiempos de cada uno de ellos, se muestran en las Tablas M2 y M3.

Tabla M2. Programas de amplificación por PCR a tiempo final. Abreviaturas: D, desnaturalización; A, anillamiento; E, extensión; T, temperatura; t, tiempo.

Nombre programa	D inicial		Ciclos						E final	
	T (°C)	t (min)	D		A		E		T (°C)	t (min)
			T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)		
PCR SELEX	94	2:00	94	0:15	60	0:30	72	0:45	72	5:00
PCR secuenciación	96	1:00	96	0:10	50	0:05	60	4:00	-	-
PCR funcional	95	2:00	95	0:30	60	0:30	72	0:20	72	2:00

Tabla M3. Programa de amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Abreviaturas: D, desnaturalización; A y E, anillamiento y extensión; R, renaturalización; T, temperatura; t, tiempo.

Nombre programa	D inicial		Ciclos				D		R		D gradual (80 ciclos)	
	T (°C)	t (min)	D		A y E*		T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)
			T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)						
qPCR de ELONA	95	1:30	95	0:03	60	0:20	95	1:00	55	1:00	55-95**	0:10

*: En la etapa E se cuantifica la señal fluorescente, que resulta proporcional a la cantidad de DNA amplificado.

**: El aumento gradual de temperatura fue de 0,5°C en cada ciclo.

3.2.2. Amplificación inicial de la población

A partir de la población inicial M1-40 de ssDNA obtenida por síntesis química, se realizó una primera PCR con objeto de obtener un mayor número de copias de cada una de las secuencias presentes en ella. La amplificación tuvo lugar en presencia de MgCl_2 a una concentración final (Cf) de 1,5 mM, dNTPs con Cf de 0,2 mM de cada uno de ellos y cada cebador (M2-F o M1-F y M1-R, Tabla M1) a Cf de 0,3 micromolar (μM). La reacción fue catalizada por la enzima *KAPA Taq* a una concentración de 0,02 U/ μl y el programa de PCR utilizado fue el denominado “PCR SELEX” (Tabla M2) con 4 ciclos. Para ello se partió de 80 pmoles (5×10^{13} moléculas) de DNA M1-40, lo que implica la obtención del orden de 11 copias de cada molécula teniendo en cuenta que se realizaron 4 ciclos de amplificación ($1,81^4$) (Hall et al. 2009).

El DNA amplificado se visualizó mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10% (apartado 3.2.10) y posteriormente se purificó mediante precipitación con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (apartado 3.2.12).

3.2.3. Amplificación de DNA por PCR a tiempo final con enzima de alta fidelidad

La mezcla de reacción de PCR a tiempo final incluyó MgCl_2 a Cf de 1,5 mM, dNTPs a Cf de 0,2 mM final de cada uno, ambos cebadores a Cf de 0,3 μM cada uno y la enzima EHF (*Expand High Fidelity*) (Ambagala et al. 2009, Farina et al. 2009) a una concentración de 0,05 U/ μl . En el caso de los aptámeros de DNA, se utilizó el cebador M1-F junto con M1-R, o bien con M1-R-5'P en caso de realizar una posterior digestión con la enzima DNA exonucleasa λ (apartado 3.2.6). Para los aptámeros de RNA se incluyó en el cebador directo la secuencia necesaria para la unión de la RNA polimerasa T7, utilizando por tanto los cebadores M2-F y M1-R (Tabla M1). Estas mismas mezclas de reacción se emplearon en los procesos de evolución *in vitro*, pero añadiendo, además, MnCl_2 a una Cf de 0,5 mM.

En todos los casos se empleó el programa “PCR SELEX” (Tabla M2), con un número variable de ciclos: entre 8 y 12 según la ronda del proceso de selección o evolución *in vitro*, y 12 para el caso del clonaje molecular de cada población de aptámeros. Respecto al DNA molde, para las PCRs de las rondas de los cuatro procesos [obtención de aptámeros con afinidad por Ebp1 mediante: selección de DNA (abreviado como DS), evolución de DNA (DE), selección de RNA (RS) y evolución de RNA (RE)] se utilizó el 90% del ssDNA obtenido (ssDNA procedente de retrotranscripción en el caso de los procesos de RNA), mientras que el 10% restante se utilizó para

clonaje. La visualización del DNA amplificado se realizó mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10% (apartado 3.2.10).

3.2.4. Amplificación de DNA por PCR mutagénica a tiempo final

Para realizar las amplificaciones con alta tasa de mutación requeridas en los procesos de evolución *in vitro* de DNA o RNA (DE y RE), se pusieron a punto protocolos de PCR a partir de una enzima de alta fidelidad, EHF, pero aumentando su tasa de mutación en distintas condiciones experimentales: con diferentes concentraciones del catión Mg^{2+} , con adición del catión Mn^{2+} o con cambio en las concentraciones relativas de los cuatro dNTPs (Goodman et al. 1983, El-Deiry et al. 1984, Leung et al. 1989, Eckert and Kunkel 1990, Cadwell and Joyce 1992, 1994).

En los tres métodos ensayados para aumentar la tasa de mutación del proceso de PCR se utilizaron 3 moldes de DNA diferentes:

1) Población M1-40, amplificada con los cebadores M1-F y M1-R (a los que se ha denominado “par M1”, Tabla M4).

2) Secuencia R5-26: secuencia conocida de 76 nucleótidos (5'-GCGGATCCAGACTGGTGTAGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTTGCGCTTGGCAGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC-3') amplificada con los cebadores del “par M1”, Tabla M4.

3) Secuencia NS2, amplificada con los cebadores del llamado “par 1b_NS2” (Tabla M4). NS2 es una secuencia de 599 nucleótidos, correspondiente a un fragmento del gen NS2 del genotipo 1b de virus de la hepatitis C (VHC), previamente amplificada en el laboratorio (Martell et al. 2004) y utilizada como control.

Tabla M4. Cebadores utilizados para las pruebas de PCRs mutagénicas.

Par	Cebadores	Moldes	Secuencia amplificada (pb)
M1	M1-F (F)	M1-40	76
	M1-R (R)	R5-26	
1b_NS2	1b NS2T7 24 (F) 1b NS2 3087 (R)	NS2	599

Las condiciones de partida de las PCRs con desbalance de nucleótidos o con adición de MnCl_2 fueron: MgCl_2 a Cf 1,5 mM final, dNTPs a Cf de cada uno de 0,2 mM, cada cebador a Cf de 0,3 μM y EHF a concentración 0,05 U/ μl . A partir de estas condiciones, se introdujo un desbalance de nucleótidos o se añadió MnCl_2 sin variar el resto de la composición de la mezcla de reacción (apartados 3.2.4.1 y 3.2.4.3).

En cuanto a las PCRs con aumento de Mg^{2+} , las condiciones de la PCR fueron: MgCl_2 a Cf 1,5 mM final, dNTPs a Cf de cada uno de 0,2 mM, cada cebador a Cf de 0,3 μM y EHF a concentración 0,035 U/ μl . A partir de éstas, se incrementó la concentración de MgCl_2 en la mezcla sin variar el resto de la composición de la mezcla de reacción (apartado 3.2.4.2).

En todos los casos se partió de 0,02 pmoles/ μl del DNA molde correspondiente (Tabla M4) y se utilizó el programa “PCR SELEX” (Tabla M2) con 12 ciclos para la amplificación.

Tras comprobar el resultado de las PCRs mutagénicas mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 10% (para M1-40 y R5-26, apartado 3.2.10) o de agarosa al 3% (para NS2, apartado 3.2.9), se realizó un clonaje molecular, secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas (apartados 3.2.16 - 3.2.18).

Para los DNA molde R5-26 y NS2 la tasa de mutación se calculó respecto a la porción de la secuencia que no formaba parte de los cebadores, analizando el número total de posiciones mutadas de entre los 40 o 559 nucleótidos, respectivamente, de dichas secuencias. Por su parte, el molde M1-40 es una población heterogénea por lo que no se calculó su tasa de mutación, sino que las PCRs mutagénicas se realizaron para evaluar la eficiencia de amplificación producida en cada caso.

3.2.4.1. PCR mutagénica por desbalance en la concentración de nucleótidos.

Para la realización de PCRs introduciendo un desbalance de nucleótidos en la mezcla de amplificación, se disminuyó o aumentó el porcentaje de A y T respecto a G y C, según se indica en la Tabla M5.

Tabla M5. Concentración final de cada uno de los dNTPs en la PCR según el desbalance de A-T empleado.

Desbalance de A-T	[A] (mM)	[T] (mM)	[G] (mM)	[C] (mM)
100% ↓ AT	0,00	0,00	0,40	0,40
90% ↓ AT	0,02	0,02	0,38	0,38
70% ↓ AT	0,06	0,06	0,34	0,34
65% ↓ AT	0,07	0,07	0,33	0,33
60% ↓ AT	0,08	0,08	0,32	0,32
50% ↓ AT	0,10	0,10	0,30	0,30
40% ↓ AT	0,12	0,12	0,28	0,28
30% ↓ AT	0,14	0,14	0,26	0,26
20% ↓ AT	0,16	0,16	0,24	0,24
10% ↓ AT	0,18	0,18	0,22	0,22
5% ↓ AT	0,19	0,19	0,21	0,21
0% (control)	0,20	0,20	0,20	0,20
30% ↑ AT	0,26	0,26	0,14	0,14
50% ↑ AT	0,30	0,30	0,10	0,10
60% ↑ AT	0,32	0,32	0,08	0,08
65% ↑ AT	0,33	0,33	0,07	0,07
70% ↑ AT	0,34	0,34	0,06	0,06
90% ↑ AT	0,38	0,38	0,02	0,02
100% ↑ AT	0,40	0,40	0,00	0,00

3.2.4.2. PCR mutagénica por aumento de la concentración de magnesio en la mezcla de reacción.

Las concentraciones de $MgCl_2$ ensayadas a partir del control positivo (PCR estándar con 1,5 mM final de $MgCl_2$) fueron: 3, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 70 y 80 mM final en el caso del molde heterogéneo M1-40, mientras que para las moléculas de DNA molde R5-26 y NS2 las concentraciones finales de $MgCl_2$ probadas fueron 10, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 mM.

3.2.4.3. PCR mutagénica por adición de manganeso a la mezcla de reacción.

La amplificación por PCR en presencia de $MnCl_2$ se ensayó con los tres tipos de DNA molde, suplementando la mezcla de reacción con diferentes concentraciones finales de $MnCl_2$: 0 (control positivo), 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 y 3 mM. En todos los casos se mantuvo una concentración final de $MgCl_2$ de 1,5 mM, y la adición del $MnCl_2$ a la mezcla de reacción se realizó en último lugar para evitar su precipitación (Cadwell and Joyce 1992).

3.2.5. Amplificación de DNA por PCR asimétrica

La PCR asimétrica se utilizó como punto de partida para la producción de DNA de cadena sencilla (ssDNA) durante los procesos de obtención y caracterización de aptámeros de DNA. La mezcla de reacción incluyó $MgCl_2$ a Cf de 1,5 mM, dNTPs a Cf 0,2 mM de cada uno, el cebador M1-F a Cf 0,4 μM , el cebador M1-R-5'P a una Cf de 0,04 μM y la enzima *Kapa Taq* a 0,04 U/ μl .

Se añadieron 0,18 pmoles/ μ l de DNA molde y se empleó el programa “PCR funcional” de la Tabla M2 con 40 ciclos.

3.2.6. Obtención de DNA de banda sencilla

La obtención de ssDNA a partir del dsDNA amplificado por PCR (simétrica o asimétrica) empleando los cebadores M1-F y M1-R-5’P se logró mediante digestión con la enzima DNA exonucleasa λ a una temperatura de 37°C durante 30 min, seguida de desactivación a 75°C durante 10 min. El volumen de reacción total fue de 100 μ l, 88 de los cuales provenían del producto de PCR que se deseaba digerir (conteniendo una cantidad variable de DNA según la ronda).

Tras la digestión, la obtención de ssDNA se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (apartado 3.2.11).

3.2.7. Retrotranscripción de RNA a DNA

La reacción de RT se llevó a cabo utilizando la enzima retrotranscriptasa *SuperScript III* a una temperatura de 50°C y durante un tiempo de reacción de 45 min, empleando M1-R como cebador de la reacción. El volumen de reacción total utilizado en las rondas de selección y evolución *in vitro* de RNA fue de 180 μ l, 90 de los cuales provenían del producto que se deseaba retrotranscribir (conteniendo una cantidad variable de RNA según la ronda).

3.2.8. Transcripción *in vitro* de RNA

La transcripción de RNA se realizó utilizando la RNA polimerasa del fago T7, partiendo de 82 pmoles de DNA amplificado, utilizando los cebadores M2-F y M1-R (Tabla M1), a una temperatura de reacción de 37 °C y durante un tiempo de 4 h, en un volumen final de 40 μ l.

Una vez realizadas las transcripciones y precipitado el RNA (apartado 3.2.12) se comprobó la eficiencia de la reacción mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (apartado 3.2.11).

3.2.9. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis de DNA del fragmento NS2, de 599 nucleótidos, se llevó a cabo en geles de agarosa al 3% (peso/volumen, p/v) preparados en TAE 1X, siendo éste el mismo tampón utilizado para la electroforesis. El tampón de carga de las muestras contenía azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (volumen/volumen, v/v), y la electroforesis se

realizó a voltaje constante (80 V) durante 45 min. Tras ello, la tinción del gel se realizó utilizando GelStar a una dilución 1/10000 durante 40 min y el DNA se visualizó por trans-iluminación con luz ultravioleta con longitud de onda (λ) de 320 nm.

3.2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas

La electroforesis de ácidos nucleicos en condiciones nativas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10% (p/v), utilizando una solución de poliacrilamida al 40% compuesta por acrilamida:bisacrilamida en proporción 19:1. Los geles se prepararon en TBE 1X, con APS (0,8% p/v) y TEMED (0,8% v/v) como catalizadores de la reacción de polimerización. El tampón de electroforesis fue TBE 0,5X, y el tampón de carga contenía azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilencianol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v). Las muestras fueron sometidas a electroforesis a voltaje constante (170 V) durante 25 min. Tras ello, la tinción del gel se llevó a cabo utilizando GelStar a dilución 1/10000 durante 20 min y el DNA se visualizó por trans-iluminación con luz ultravioleta ($\lambda=320$ nm).

3.2.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis de ácidos nucleicos en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10% (p/v), utilizando una solución de poliacrilamida al 40% compuesta por acrilamida:bisacrilamida en proporción 19:1. Los geles se prepararon en TBE 1X, con urea a concentración 7 M como agente desnaturalizante, y APS (0,8% p/v) y TEMED (0,8% v/v) como catalizadores. Las muestras se prepararon en un tampón de carga desnaturalizante compuesto por 95% (v/v) formamida, 0,025% (v/v) SDS, 0,025% (p/v) azul de bromofenol, 0,025% (p/v) xilencianol y 0,5 mM EDTA. Las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C y se mantuvieron en hielo hasta ser cargadas (2-5 min). La electroforesis se llevó a cabo a 170 V durante 25 min en TBE 0,5X. Tras ello, la tinción se efectuó utilizando GelStar a dilución 1/10000 durante 20 min y los ácidos nucleicos se visualizaron por trans-iluminación con luz ultravioleta ($\lambda=320$ nm).

3.2.12. Precipitación de ácidos nucleicos

3.2.12.1. Precipitación de DNA con acetato de sodio.

La precipitación de las muestras de DNA se realizó con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M a pH 5,5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Tras ello, las muestras se mantuvieron un

mínimo de 30 min a -80°C. A continuación se centrifugaron durante 30 min a 4°C y 13200 r.p.m. (revoluciones por minuto, equivalentes a una aceleración relativa 16100 g en la centrífuga utilizada). Se retiró el sobrenadante, el sedimento de DNA se lavó con 200 µl de etanol al 70% y se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones. Una vez retirado el segundo sobrenadante, el sedimento se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de H₂O DEPC.

3.2.12.2. Precipitación de RNA con acetato de amonio.

La precipitación de las muestras de RNA se realizó con 1 volumen de acetato de amonio 5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Tras ello, las muestras se mantuvieron un mínimo de 30 min a -80°C. A continuación se centrifugaron durante 30 min a 4°C y 13200 r.p.m. (16100 g). Se retiró el sobrenadante, el sedimento de RNA se lavó con 200 µl de etanol al 70% y se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones que la primera. Una vez retirado el segundo sobrenadante, el sedimento se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de H₂O DEPC.

3.2.13. Producción de la proteína diana Ebp1

La proteína Ebp1 de ratón (*Mus musculus*) fue producida por el grupo de la Profesora Encarnación Martínez-Salas en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, CSIC-UAM).

Esta proteína se produce en un sistema de expresión en *E. coli* que genera el polipéptido unido a una cola de 6 histidinas (6xHis) en su extremo N-terminal, lo que permite su posterior unión a una resina de Ni-sefariosa. El proceso de producción de Ebp1 comenzó con la inoculación de una colonia, que contenía el plásmido recombinante con el inserto [pET(His₆-ITAF45)] correspondiente, en medio LB con kanamicina y su incubación durante 16 h a 37°C y 200 r.p.m., para a continuación realizar un subcultivo en medio fresco. Este subcultivo se incubó en las mismas condiciones de temperatura y agitación anteriores hasta conseguir la duplicación de la población bacteriana inicial, medida por el correspondiente incremento de la densidad óptica. En este momento se añadió al cultivo IPTG 1 M para lograr la inducción del operón que porta el plásmido, lo que produjo la expresión del gen de Ebp1, y se mantuvo la incubación durante 1 h más a 37°C y 200 r.p.m. Transcurrido este tiempo, se centrifugó el cultivo durante 10 min a 6000 r.p.m. y 4°C, y se retiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en el tampón “Buffer Binding 20 mM” (NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM) empleando 1 ml de tampón por cada 0,1 g de sedimento. A continuación, y en hielo, las células se fragmentaron y homogeneizaron mediante ultrasonidos, y se centrifugó 20 min a 10000 r.p.m. a 4°C. El sobrenadante se transfirió a

un nuevo tubo y se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 20 min a 4°C. El nuevo sobrenadante obtenido se añadió a una columna con resina Ni-sefarosa que permite la unión de la proteína expresada gracias a su cola 6xHis. En la columna se hicieron 2 lavados con “Buffer Binding 20 mM” y la proteína se eluyó empleando el tampón de elución (NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM).

Una vez eluida la proteína Ebp1, se comprobó su presencia e integridad mediante electroforesis en gel de acrilamida:bisacrilamida al 12% en dos fases, una superior o concentradora [“*stacking gel*”: Tris pH 6,8 a Cf de 0,125 M, 5% acrilamida:bisacrilamida en proporción 29:1, SDS (0,1% v/v), APS (0,1% p/v), TEMED (0,001% v/v)] y otra de resolución [“*resolving gel*”: Tris pH 8,8 a Cf de 0,39 M, 12% de acrilamida:bisacrilamida en proporción 29:1, SDS (0,1% v/v), APS (0,1% p/v), TEMED (0,0004% v/v)] a intensidad de corriente constante (20 mA) hasta la salida del frente en el gel. El gel fue teñido con azul de Coomassie durante 20 min. Tras ello, se realizó un proceso de diálisis de la muestra durante 14-16 h a 4°C. En la diálisis se utilizó primero un tampón compuesto por NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 1 M, EDTA 1 mM y DTT 25 mM, y a continuación otro con la misma composición pero suplementado con glicerol al 50%.

Tras la diálisis se comprobó de nuevo la presencia e integridad de la proteína Ebp1 mediante electroforesis en gel de acrilamida:bisacrilamida al 12% en dos fases y tinción del mismo con azul de Coomassie durante 20 min. Por último, tras secar el gel durante 40 min a 80°C, se procedió a la cuantificación de la proteína mediante la comparación de banda con el patrón de peso molecular cargado en el mismo gel.

3.2.14. Unión de la proteína diana Ebp1 al soporte para los procesos de selección o evolución *in vitro*

Para la realización de las rondas de selección y evolución *in vitro* contra la proteína Ebp1, ésta debe estar unida a un soporte, que en este caso fue la resina Ni-NTA agarosa (*Ni-NTA agarose*). Se unieron, siguiendo las instrucciones del fabricante, $9,90 \times 10^{11}$ moléculas de proteína por cada μl de resina. Para ello, se prepararon lotes de 1 μl de Ebp1 en el tampón de selección (TS), a una concentración de $1,23 \times 10^{14}$ moléculas/ μl , y se incubaron con 125 μl de resina a 4°C durante 4 h en un agitador rotativo vertical. A continuación se realizaron 3 lavados con TS. Cada lavado consistió en la adición de 1 ml de TS y posterior centrifugación a 4°C durante 10 min a 13000 r.p.m. (15615 g), retirando el sobrenadante tras cada lavado. La proteína unida a la resina con Ni²⁺ se conservó a 4°C en TS hasta su utilización.

3.2.15. Selección y evolución *in vitro* de aptámeros de DNA y RNA específicos de Ebp1

La selección y evolución de aptámeros de DNA y RNA (DS, RS, DE y RE) con afinidad por Ebp1 se llevó a cabo siguiendo un procedimiento general que partía de una población inicial de ácido nucleico y de proteína diana con un ratio de moléculas de ácido nucleico:Ebp1 de $\approx 20:1$ (concretamente, 408 pmoles de DNA frente a 20,5 pmoles de Ebp1 y 816 pmoles de RNA frente a 41 pmoles de Ebp1). Con ello se realizaron 8 rondas de selección (DS y RS) o evolución (DE y RE). Para comenzar cada ronda fue necesario preparar la población de ácidos nucleicos, obtenida según lo indicado en los apartados 3.2.6 (para DNA) o 3.2.8 (para RNA), mediante desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguida de renaturalización a 37°C durante 5 min.

Antes de iniciar el proceso de obtención de aptámeros contra Ebp1, se realizó una selección negativa contra el soporte utilizado en el proceso. En ella, la población inicial se incubó con resina Ni-NTA agarosa (sin Ebp1 unida) durante 1 h a 37°C y 1400 r.p.m. Tras esta incubación, se realizó una centrifugación de 10 min a 4°C y 13000 r.p.m. (15615 g) cuyo sobrenadante (fracción no unida a la resina) se empleó directamente para realizar la primera ronda de selección específica.

Cada ronda del proceso de selección o evolución consistió en la incubación de la población de oligonucleótidos, renaturalizados en 90 μ l de TS, con el complejo resina-Ebp1, durante 1 h a 37°C y 1400 r.p.m. Tras ello, se centrifugó la muestra durante 10 min a 4°C y 13000 r.p.m. y se retiró el sobrenadante. A continuación se realizaron lavados (un lavado en las rondas 1-4 de cada proceso y dos lavados en las rondas 5-8, aumentando así la presión selectiva) con 500 μ l de TS, lo que permitió eliminar las moléculas de ssDNA o RNA no unidas a su diana. Tras cada lavado se centrifugó durante 10 min a 4°C y 13000 r.p.m., y se retiró el sobrenadante. Tras el último lavado, el sedimento se resuspendió en 90 μ l de H₂O tratada con DEPC. Esta suspensión se calentó durante 5 min a 95°C para separar los aptámeros unidos específicamente a Ebp1 del complejo resina-proteína y se centrifugó 10 min a 13000 r.p.m. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo para la utilización y conservación de los aptámeros seleccionados.

En el caso de los procesos de DNA, el 90% del DNA seleccionado (81 μ l del sobrenadante obtenido) se amplificó utilizando los cebadores M1-F y M1-R marcado con 5'P (Tabla M1) mediante una PCR a tiempo final (programa "PCR SELEX", Tabla M2), de alta fidelidad para DS y mutagénica para DE (apartado 3.2.3, con 0,5 mM de MnCl₂ en el caso de DE). A continuación, se realizó la digestión del dsDNA obtenido con la enzima DNA exonucleasa λ (apartado 3.2.6). El ssDNA resultante se utilizó para iniciar un nuevo ciclo de selección, y así sucesivamente hasta alcanzar un total de 8 rondas.

En los procesos de RNA, todo el RNA seleccionado (90 μ l) se retrotranscribió a DNA (apartado 3.2.7), y el 90% de este DNA se amplificó utilizando los cebadores M2-F y M1-R (Tabla M1) mediante PCR (programa “PCR SELEX”, Tabla M2), de alta fidelidad para RS y mutagénica para RE (apartado 3.2.3, con 0,5 mM de $MnCl_2$ en el caso de RE). Este DNA amplificado se transcribió *in vitro* a RNA (apartado 3.2.8) para comenzar un nuevo ciclo de selección. Este proceso se repitió sucesivamente hasta alcanzar el total de 8 rondas en cada proceso.

Tanto en los procesos de DNA como de RNA, el 10% de las moléculas de ssDNA resultantes de cada ronda (procedentes de RT en el caso de RS y RE) se amplificó mediante una PCR de alta fidelidad (apartado 3.2.3), utilizando los cebadores M1-F y M1-R (Tabla M1) y una concentración de DNA molde de 0,02 pmoles/ μ l, para poder realizar el posterior clonaje molecular de cada una de las rondas (apartado 3.2.16).

Tabla M6. Principales diferencias durante la realización de los procesos de DS, DE, RS y RE de aptámeros con afinidad por Ebp1.

	DS	DE	RS	RE
Cantidad inicial de aptámeros (pmoles)	408	408	816	816
Cantidad inicial de Ebp1 (pmoles)	20,5	20,5	41	41
Aptámeros:Ebp1	$\approx 20:1$	$\approx 20:1$	$\approx 20:1$	$\approx 20:1$
Etapas tras la recuperación de aptámeros	1) PCR de alta fidelidad 2) Obtención de ssDNA	1) PCR mutagénica* 2) Obtención de ssDNA	1) RT 2) PCR de alta fidelidad 3) IVT	1) RT 2) PCR mutagénica* 3) IVT

* Las PCRs mutagénicas de los procesos DE y RE se realizaron mediante la adición de 0,5 mM de $MnCl_2$ a la mezcla de reacción.

3.2.16. Clonaje molecular de las poblaciones de aptámeros en *E. coli*

El clonaje molecular de las poblaciones obtenidas en los procesos de selección y evolución *in vitro*, tanto de DNA como de RNA, se llevó a cabo a partir de las PCRs de alta fidelidad a tiempo final realizadas tras cada ronda de selección y mencionadas en el apartado 3.2.15. Las fases del clonaje de ligación y transformación se realizaron utilizando el kit “TOPO TA cloning PCR II” y las células “One Shot Mach1-T1” de *E. coli* químicamente competentes, siguiendo en ambos casos las instrucciones indicadas por el fabricante. Brevemente, a la reacción de ligación compuesta por solución salina (NaCl 1,2 M y $MgCl_2$ 60 mM) y vector TOPO se añadieron 2 μ l del DNA previamente amplificado por PCR y se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente (entre 20°C y

25°C). A continuación las reacciones se mantuvieron en hielo hasta su utilización para la transformación. Para cada transformación se añadieron 2 µl del producto de la ligación al vial con 50 µl de células competentes de *E. coli*. Tras este paso, la mezcla de transformación se incubó 30 min en hielo, seguido de un choque térmico a 42°C durante 30 segundos e incubación en hielo durante 5 min. Se añadieron 250 µl de medio S.O.C. al vial y se incubó durante 1 h a 37°C en agitación horizontal (250 r.p.m.). A continuación, las células transformadas se cultivaron en medio LB agar con 50 µg/ml de ampicilina y con X-Gal (40 µl de X-Gal a 40 mg/ml en DMF por cada placa de petri con LB agar) a 37°C durante 14-16 h.

Se subcultivaron un mínimo de 30 colonias blancas en 1,5 ml de medio Terrific Broth (TB) con 50 µg/ml de ampicilina, durante 14-16 h a 37°C y en agitación (250 r.p.m.). Parte de estos cultivos (100 µl de cada uno) se conservaron en placas de polipropileno de 96 pocillos con 100 µl de glicerol al 30%, a -80°C. El resto de cada cultivo se utilizó para purificar el DNA plasmídico mediante los kits “QIAprep Miniprep” o “Perfectprep Plasmid 96 Vac Base Kit”. Para comprobar si la ligación realmente se había producido, los insertos contenidos en los plásmidos recombinantes se amplificaron mediante PCR (apartado 3.2.3).

3.2.17. Secuenciación de DNA

Las reacciones de secuenciación de DNA (Sanger et al. 1977) fueron realizadas en la Unidad de Secuenciación y Genómica del Centro de Astrobiología (CSIC-INTA), utilizando el secuenciador Abi 3730xl de 48 capilares.

La mezcla de la reacción de secuenciación contenía 1,6 pmol del cebador M13-F (M13-F y M13-R para el caso de la secuencia NS2), 2 µl de la mix de secuenciación incluida en el kit “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (compuesta por la enzima *AmpliTaq* DNA polimerasa, un tampón 1X-EDTA, dNTPs y dNTPs marcados fluorescentemente) y 250-300 ng/µl del molde de DNA, utilizando el programa denominado “PCR secuenciación” (Tabla M2) con 25 ciclos. Se obtuvieron, al menos, 10 secuencias clonales de los diferentes ensayos de PCRs mutagénicas y 30 secuencias clonales de cada una de las rondas de los procesos de selección y evolución.

3.2.18. Análisis y tratamiento de secuencias

Las secuencias de DNA obtenidas se comprobaron utilizando el programa informático Chromas Lite v2.01 y, en todos los casos, las secuencias obtenidas mediante ambos cebadores fueron ensambladas utilizando el programa Seqman (contenido en el paquete DNASTAR). Una vez comprobadas las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple de todas las secuencias de cada

una de las rondas (y posteriormente del total de las rondas de cada proceso) empleando el programa ClustalW (Thompson et al. 1994). El alineamiento se visualizó con el programa GeneDoc v2.7 (Nicholas et al. 1997), que también permitió editar los alineamientos cuando fue necesario. Paralelamente, se analizó el contenido nucleotídico de la región variable de todas las secuencias, tanto globalmente como por posición.

Además del análisis de las secuencias obtenidas, la determinación de sus estructuras secundarias (y el cálculo de los parámetros termodinámicos asociados a las mismas) se realizó mediante plegamiento *in silico* de todas ellas mediante las plataformas informáticas RNAfold (Lorenz et al. 2011) y mfold (Zuker 2003).

3.2.19. Determinación de la afinidad entre los aptámeros de DNA o RNA y la proteína Ebp1 por *SELEX-like binding assay* (SELBA)

La determinación de la afinidad entre los aptámeros y la proteína diana se estudió mediante diferentes técnicas, la primera de las cuales consistió en un ensayo similar a un ciclo de selección de SELEX. Para ello se partió de 50 pmoles de DNA o RNA en TS y 12,5 pmoles de Ebp1 (relación 4:1). Al igual que en un ciclo de SELEX, la población de DNA o RNA de las diferentes rondas se desnaturizó durante 5 min a 95°C y se renaturalizó durante 5 min a 37°C en 90 µl de TS.

En todos los casos se realizó una primera incubación de los aptámeros con resina Ni-NTA agarosa (sin Ebp1 unida) durante 1 h a 37°C con agitación 1400 r.p.m. en TS. Se centrifugó 10 min a 13000 r.p.m. (15615 g) y el sobrenadante se incubó con resina-Ebp1 en TS durante 1 h a 37°C y 1400 r.p.m. Tras ello, se centrifugó 10 min a 13000 r.p.m., se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de TS para lavar los aptámeros no unidos. Se centrifugó 10 min a 13000 r.p.m., se retiró el sobrenadante y se añadieron 90 µl de H₂O DEPC. A continuación se calentó la muestra durante 5 min a 95°C para desnaturizar y separar los aptámeros unidos a Ebp1 del complejo resina-proteína. Por último, se realizó una centrifugación de 10 min a 13000 r.p.m. y el sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo con el que se llevó a cabo una PCR (o RT-PCR en el caso de aptámeros de RNA) a tiempo final para comprobar la cantidad de DNA (o RNA) recuperado.

En el caso de las PCRs, éstas se llevaron a cabo con el programa “PCR funcional” (Tabla M2) con 15 ciclos y utilizando 2,5 µl de muestra (de una dilución 1/20 de los 90 µl obtenidos de la incubación) en un volumen final de 25 µl. Además, la mezcla de PCR incluyó MgCl₂ a Cf de 1,5 mM, dNTPs a Cf de 0,2 mM de cada uno, los cebadores M1-F y M1-R cada uno a 0,2 µM final y *Kapa Taq* a 0,02 U/µl.

En cuanto al RNA, las RT-PCRs se llevaron a cabo en un solo paso con “*SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase*”, utilizando 4,3 µl de molde de RNA (de una dilución 1/2 de los 90 µl obtenidos de la incubación) en 10 µl de volumen final. Este volumen de RT-PCR incluyó además MgSO₄ a Cf 1,6 mM, los cebadores M2-F y M1-R a 0,5 µM final de cada uno y *Enzyme mix* (que contiene tanto las enzimas como los dNTPs) a una concentración de 0,1 U/µl. Las RT-PCRs consistieron en una retrotranscripción a 50°C durante 30 min seguida de un programa de PCR igual al de DNA (programa “PCR funcional”, Tabla M2), pero con 7 ciclos en lugar de 15. Los resultados tanto de las PCRs como de las RT-PCRs se comprobaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 3.2.10).

3.2.20. Determinación de la afinidad entre los aptámeros de RNA y la proteína Ebp1 por SELBA de afinidad

Se realizó una modificación del ensayo mostrado en el apartado anterior empleando los aptámeros de RNA. En este caso se partió de distintas cantidades de las poblaciones de RNA mantenidas en TS, concretamente, se utilizaron poblaciones con 0,1, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 y 100 pmoles de RNA. Estas poblaciones se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C y se renaturalizaron durante 5 min a 37°C. A continuación se incubaron frente a 10,5 pmoles de Ebp1 (sin resina) durante 30 min a 37°C y agitación 1400 r.p.m. Tras esta primera incubación se añadió resina (sin Ebp1 unida) y se incubó durante 30 min a 37°C y 1400 r.p.m. Las mismas poblaciones también se incubaron en paralelo sin añadir Ebp1 (solamente con resina) como control negativo.

Tras la incubación con la resina, se centrifugó 10 min a 13000 r.p.m. (15615 g), se retiró el sobrenadante y se lavó con 1 ml de TS. Se centrifugó 10 min a 13000 r.p.m., se retiró el sobrenadante y se añadieron 90 µl de H₂O DEPC al sedimento. A continuación se calentó la muestra a 95°C durante 5 min para eluir los aptámeros de la resina. Por último, se hizo una centrifugación de 10 min a 13000 r.p.m. y el sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo desde el que se realizaron RT-PCRs.

Las RT-PCRs se llevaron a cabo en un solo paso utilizando 4,3 µl de molde de RNA (de una dilución 1/2 de los 90 µl obtenidos de la incubación) en 10 µl de volumen final. Este volumen de RT-PCR incluyó además Cf 1,6 mM de MgSO₄, los cebadores M2-F y M1-R a Cf 0,5 µM de cada uno y *Enzyme mix* a una concentración de 0,1 U/µl. Las RT-PCRs comenzaron con una retrotranscripción a 50°C durante 30 min seguida de un programa de PCR de 7 ciclos (programa “PCR funcional”, Tabla M2). Los resultados de las diferentes RT-PCRs realizadas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 3.2.10).

3.2.21. Determinación de la afinidad entre los aptámeros y la proteína Ebp1 mediante *Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay* (ELONA)

3.2.21.1. ELONA modificado acoplado a PCR o RT-PCR.

Esta técnica es una modificación del ELONA clásico (Drolet et al. 1996) que permite trabajar con aptámeros que no se encuentran marcados. En una placa multipocillo (NUNCLON-Maxisorp) se incubaron 8,54 pmoles/pocillo de Ebp1 o 6 pmoles/pocillo de BSA, en un volumen final de 200 µl por pocillo, durante 16 h a 4°C en un agitador horizontal rotativo y basculante. Tras un lavado con PBS 1X, los pocillos fueron bloqueados con 200 µl/pocillo de BSA 5% durante 1 h a 37°C con agitación a 110 r.p.m. A continuación, se realizaron 4 lavados con PBS 1X.

Por otra parte, los aptámeros sin modificar se desnaturalizaron a 95°C durante 10 min y se renaturalizaron a 37°C durante 10 min. Los aptámeros renaturalizados se incubaron a una concentración final de 80 nM en 200 µl de TS. Se realizó un triplicado de cada una de las rondas tanto para Ebp1 como para BSA.

Tras incubar 1 h a 37°C en estufa y con agitación de 110 r.p.m. se realizaron 6 lavados en TS. Finalmente se añadieron 90 µl de H₂O DEPC a cada pocillo y se incubó la placa 10 minutos a 95°C para desnaturalizar y eluir los aptámeros unidos, que posteriormente se amplificaron por PCR o RT-PCR.

En el caso de los aptámeros de DNA, se realizó una amplificación por PCR con Cf 1,5 mM de MgCl₂, Cf 0,2 mM de cada dNTP, Cf 0,2 µM de cada cebador M1-F y M1-R, 0,02 U/µl de *Kapa Taq* y 5 µl de molde (de los 90 µl obtenidos de la incubación) en un volumen final de 10 µl, empleando el programa “PCR funcional” (Tabla M2) con 12 ciclos.

En cuanto a los aptámeros de RNA, se realizó una RT-PCR en un solo paso utilizando Cf 1,6 mM de MgSO₄, Cf 0,5 µM final de cada uno de los cebadores M2-F y M1-R, 0,1 U/µl de *Enzyme mix* y 4,3 µl de RNA molde (de los 90 µl obtenidos de la incubación), en volumen final de 10 µl. Se empleó el programa “PCR funcional” (Tabla M2) con 7 ciclos precedido de una retrotranscripción a 50°C durante 30 min.

Los resultados tanto de las PCRs como de las RT-PCRs se analizaron mediante electroforesis en condiciones nativas de geles de acrilamida al 10% (apartado 3.2.10).

3.2.21.2. ELONA acoplado a PCR cuantitativa (qPCR) o RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Esta técnica, puesta a punto en el presente trabajo, es una modificación de la expuesta en el apartado anterior cuyas diferencias se exponen a continuación tanto para DNA como para RNA.

En el caso del DNA, las diferencias con respecto al protocolo mostrado en el apartado 3.2.21.1 fueron, en primer lugar, que tras el bloqueo con BSA 5% se realizó un solo lavado con 200 μ l de PBS 1X. La otra diferencia fue que el DNA recuperado se amplificó por PCR cuantitativa en lugar de por PCR a tiempo final. La amplificación de DNA mediante qPCR se realizó utilizando el kit “*KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X)*”, cuya Master Mix incluye SYBR Green a la concentración optimizada por el fabricante. Además, se añadieron los cebadores M1-F y M1-R a una Cf de 0,062 μ M de cada uno ellos y 5 μ l de DNA molde (de los 90 μ l obtenidos de la incubación) en un volumen final de 15 μ l. Esta reacción de amplificación se llevó a cabo mediante el programa “qPCR de ELONA” de 25 ciclos mostrado en la Tabla M3.

En cuanto al RNA, el protocolo utilizado mostró más diferencias respecto al indicado en 3.2.21.1. Por una parte, para los ELONAs de RNA la incubación de la proteína Ebp1 se realizó, al igual que con DNA, durante 16 h a 4°C en un agitador horizontal rotativo y basculante, pero seguida por una incubación adicional de 1 h a 37°C en una estufa con agitación a 110 r.p.m. Además, tras dicha incubación no se realizó lavado intermedio antes de bloquear con BSA 5%, sino que se desechó el volumen de ésta y se procedió directamente al bloqueo con BSA. Tras esto, y al igual que en el caso del DNA, el lavado del BSA 5% no bloqueado se efectuó mediante un solo lavado con 200 μ l de PBS 1X. Otro cambio en cuanto a los lavados se realizó tras la incubación de los aptámeros, en cuyo caso se realizaron 3 lavados. Tras ellos, se añadieron 90 μ l de H₂O DEPC a cada pocillo para eluir los aptámeros unidos mediante una incubación de la placa durante 10 minutos a 95°C. Los aptámeros eluidos fueron amplificados mediante RT-qPCR.

La RT-qPCR se realizó utilizando el kit “*SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR*” (cuya “2X SYBR Green Reaction Mix” incluye SYBR Green a una concentración optimizada por el fabricante) tal y como indica el fabricante. La mezcla, con un volumen final de 10 μ l, también incluyó el cebador M2-F a una Cf de 0,2 μ M, el cebador M1-R a Cf de 0,05 μ M, 4,67 μ l de molde (de los 90 μ l obtenidos de la incubación) y 0,2 μ l de la mezcla de enzimas *SuperScript III* RT y *Platinum Taq*. Se utilizó el programa “qPCR de ELONA” de la Tabla M3 con 30 ciclos precedido de una retrotranscripción a 50°C durante 20 min.

Tanto para DNA como para RNA se realizó un triplicado de cada una de las muestras ensayadas: i) concentración fija de rondas y clones moleculares: 80 nM; ii) concentración creciente de clones moleculares: 5, 8, 20, 40, 80, 125, 250 y 375 nM.

3.2.22. Visualización de la estructura de ácidos nucleicos y complejos ácido nucleico-proteína mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La estructura tridimensional del elemento IRES de FMDV y de la proteína Ebp1 se visualizó mediante microscopía de fuerza atómica (*Atomic Force Microscope*, AFM), en colaboración con el Laboratorio de Nuevas Microscopías del Centro de Astrobiología (CSIC-INTA), dirigido por el Profesor José Ángel Martín Gago.

El protocolo seguido comenzó con la exfoliación de la mica sobre la que se depositó posteriormente la muestra. Esto se realizó por el modo estándar de exfoliación micromecánica con cinta adhesiva, para conseguir una sola capa uniforme de mica. Una vez exfoliada la mica, se realizó una primera incubación en APTES al 0,1% en agua milli-Q durante 15 min, en agitación y a temperatura ambiente (entre 20°C y 25°C). A continuación, la superficie modificada se lavó una vez con isopropanol y tres veces con agua milli-Q. Tras secar la placa de mica a 37°C durante 30 min, se añadió la muestra y se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda durante un tiempo variable según la muestra que se iba a analizar. Por último, también se hicieron tres lavados con agua milli-Q y se dejó secar la mica antes de proceder a su observación por AFM (Lyubchenko et al. 1993, García-Sacristán et al. 2014).

Los primeros ensayos consistieron en la observación del elemento IRES de FMDV. Para ello, $3,94 \times 10^{-2}$ pmoles de IRES, en 30 µl de volumen final de TS, se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y se renaturalizaron a 4°C durante 5 min seguidos de 20 min a 37°C. Una vez renaturalizado, el IRES se añadió a la mica y se dejó incubar 20 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Por último se lavó la muestra tres veces con agua milli-Q y se dejó secar.

Por otra parte, se visualizó la proteína Ebp1 utilizando $3,94 \times 10^{-2}$ pmoles (en 30 µl de volumen final de TS), incubándola a 37°C durante 20 min en TS, seguida de otra incubación a temperatura ambiente durante 20 min, en cámara húmeda.

Por último, se hicieron dos pruebas de la incubación conjunta de la proteína Ebp1 con el IRES de FMDV. En el primer ensayo, añadiendo $3,94 \times 10^{-2}$ pmoles de cada molécula, primero se incubaron de modo independiente el IRES de FMDV y Ebp1, tal como se ha indicado anteriormente. Tras ello se realizó una mezcla de ambas moléculas y se incubaron en disolución durante 1 h a 37°C. La muestra de IRES+Ebp1 incubada se añadió a la mica y se incubó a

temperatura ambiente en cámara húmeda durante 1 h. En el segundo ensayo, análogo al anterior, se utilizó la mitad de número de moléculas, tanto de IRES como de proteína ($1,97 \times 10^{-2}$ pmoles de cada una), pero se dejó incubar la muestra sobre la mica durante 2 h.

En cuanto a la toma de imágenes por AFM, ésta se realizó a temperatura ambiente y en modo *tapping* en aire, usando micropalancas con una fuerza constante de 0,5-9,5 N/m y una frecuencia de resonancia de 50-80 kHz. Además se emplearon dos tipos de puntas, con radios de curvatura de 2 y 10 nm, para obtener diferentes niveles de resolución de las imágenes. Dichas imágenes se adquirieron mediante el *software* WSxM v3.1. Utilizando este programa y el *software* Image-J, se midieron diferentes parámetros estructurales de las moléculas (García-Sacristán et al. 2014).

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS DE LA HETEROGENEIDAD DE LA POBLACIÓN INICIAL

El clonaje molecular de la población combinatorial inicial y la secuenciación de 42 de los clones obtenidos mostró, al analizar el porcentaje de cada uno de los nucleótidos en la región variable de las secuencias, una mayor proporción del nucleótido T (Figura R1).

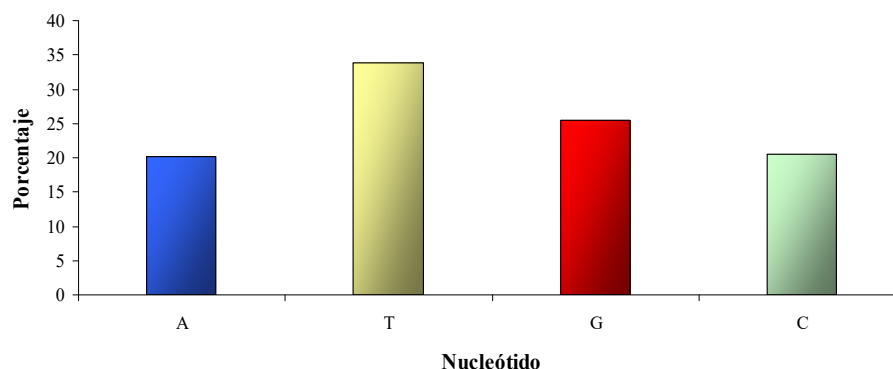


Figura R1. Representación gráfica del porcentaje global de cada nucleótido en la parte variable de las secuencias (40 nt) de la población combinatorial inicial. El nucleótido T era predominante (33,87%) sobre G (25,51%), C (20,43%) y A (20,19%).

También se realizó el análisis del porcentaje de cada nucleótido en cada una de las posiciones de la región variable de esta población inicial (Figura R2).

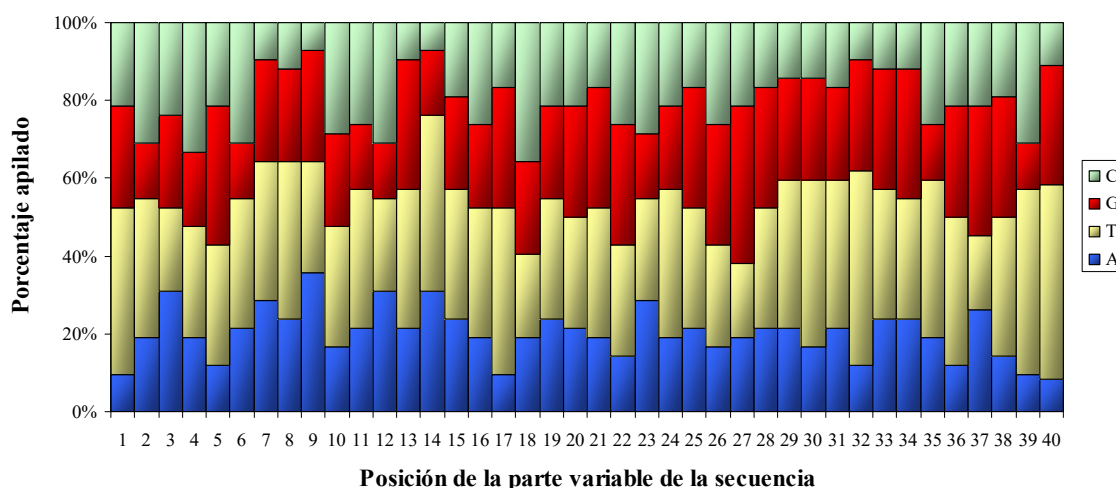


Figura R2. Representación gráfica del porcentaje apilado de cada uno de los nucleótidos, por posición, en la región variable de la población inicial, en sentido 5'-3'.

4. RESULTADOS

Por último, mediante el alineamiento de secuencias se observó que las secuencias números 12, 13 y 14 resultaron ser iguales a las secuencias 26, 24 y 30, respectivamente (Tabla R1).

Tabla R1. Alineamiento de las secuencias obtenidas mediante clonaje molecular de la población aleatoria inicial (población inicial de DNA denominada “00DINI” para distinguirla de las rondas “01” a “08”) con la que se comenzaron los procesos selectivos y evolutivos de obtención de aptámeros. Alineamiento realizado mediante ClustalW en el que se muestra solamente la porción variable de las secuencias. Los nombres de las secuencias repetidas se han subrayado.

Nombre	Secuencia 5'-3'
00DINI11	-----TTACTGTACCTAAGACGGTGCGCCTCTTCGTATGGATCCC-----
00DINI29	-----GCGGGCTGACTA-GATTGAGGACATATTCTCCTGTATCCTT-----
00DINI21	-----TTTCACAGTGCCCTGTATATCGCTATGCAATCCCCCGGCA---
00DINI39	--TGCTTTTGTGATCAAGCTGGCCTGCATGTGGATTGTTAA-----
00DINI04	-----TCAAATGCAATCA--TGCTGGGACCGGAGGTGTTTGCTATTT---
00DINI31	-----GTGAACCAGCTGAAATGGGGTGCCGGCGCAGGATGTGCTT-----
00DINI08	-----TTACGTATTAGGCTTCGAGACACTA-ACGGTTATCAGTATC-----
00DINI28	GTGTTATGAAATTATAGGCGTCTCGTAAGTACGTTTA-----
00DINI22	-----CTTAATAATCGTGGCATGAGAGGAACGAGTGCAGCAATCG-----
00DINI25	-----GTATCCGTATCATGATTTCGATCGTTGCCGGTTAAAGCGTT--
00DINI09	----TTGGTCATGCTGGAGCAGCTATGCTCG-AGCAGTGCGGTCG-----
00DINI42	-----GATATTATATATTGCGTGAGATCG-ATACTCGTTATCGTAT-----
00DINI05	-----TTACCCCTTAT--TCTCCCGGATTCTTCGCGCTTAGGTCTGT----
00DINI06	-TAATGGGTGGAAATGGTA-TTCTCTGGTTGTTTGCTCT-----
00DINI16	---CTGCGCCGGAATATTT-CCTAGTTAGTTTTGCGTATTGACC-----
00DINI35	-----GTCTCACTTCTTATCTACTCGGTCATGC-TGTTGGACAGTG-----
00DINI12	-----TCTGCAATGGAAGT-ACGCGCCTCACCGATTCTGTTCAAT-----
00DINI26	-----TCTGCAATGGAAGT-ACGCGCCTCACCGATTCTGTTCAAT-----
00DINI33	-----CGCATTTCACATGATTTTGCGTTGTGGTACGGTGTGTGTCG-----
00DINI41	-----GAACGGTCTTTTCGTATCACCTAATTCTG-GTTGGGGGGCCA-----
00DINI18	-----TCACGCGCAGTTTTTCTCATAGGTACGTGGCGTCTGAGAG-----
00DINI34	-----TATTGATTTTAGATATTTTCAATCCGAGTTTGTGCTATT
00DINI01	---TAATCCAGAAGTACCCCTCCGCCCTCACTTAATGATGTGT-----
00DINI23	-----GTCGACCTAACTTTAAGCTGTTGTCTATAAATATACCTCG-----
00DINI02	-----GACTGATGAGCCGGTGTGTT-GTGATATGGTATTATTAGT-----
00DINI10	-----TCACGGTGA-TTGTCGTGCTATTTTATTCTTTGGCTAGCT-----
00DINI20	-----TACGTAA-TTCATGTGTTAATGTGGACTTATCTGCGGAGG----
00DINI03	-----CCTATCAAC-CGTCTTCACTGGATTGAGAAGGGTTTTTCG-----
00DINI19	-----TCTATGTGTCTACATTTTCGTCCAGCGGGTTGAGGCGGTTT-----
00DINI15	-----ATCTTAGTTGACAATTCTTCG-CTTGCAGACTTCTGACGC-----
00DINI36	-----CGACTTAACTAGAAGTCATTTCGGCTGGGGGATACCTTCTG-----
00DINI07	-----GGCCCGTTAACCGTTTCGTAGTGATAAGATTGGTTATGGTG----
00DINI32	-----AAGGTTTAGTT-CTATTTACA-TGATGGGTTTTCTTTTCGTG----
00DINI13	-----TCCCGAGAGCCCT--TCGTCCAGATCGGTTAAGTGACTAGTT-----
00DINI24	-----TCCCGAGAGCCCT--TCGTCCAGATCGGTTAAGTGACTAGTT-----
00DINI14	----CCGTGTGTGGGCGTGG-TTATTGAATTCGAGATAATGGCTT-----
00DINI30	----CCGTGTGTGGGCGTGG-TTATTGAATTCGAGATAATGGCTT-----
00DINI37	-----ATGATTGCT--TCATTGAACT---AGTAACGGTTTATGGATCGGT
00DINI38	-----CGACGTGTACGAGTAGCGGTTAGATCAGGTTAACACTTT-----
00DINI17	-----CCGGCATGATCGTACATCTTTTGGTCTCTTCATCACC-----
00DINI27	-----GTATCCTAGGTAGAGAGCGAGAAGGGAGCTCGCTTGGTTC----
00DINI40	-----AGTCGCTTTTTCTAACTAAGACCGGAAATTCGTTTATGGT-----

4.2. DETERMINACIÓN DEL MÉTODO PARA INCREMENTAR LA TASA DE MUTACIÓN EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la realización de los procesos de evolución *in vitro* de DNA (DE) y de RNA (RE) fue necesario establecer el procedimiento que permitiera incrementar la tasa de mutación asociada a la fase de amplificación de cada ronda. El método de elección fue el incremento de la tasa de mutación asociada a la amplificación por PCR, ya que puede ser aplicado en ambos procesos, DE y RE. Para ponerlo a punto se realizaron las pruebas descritas en el apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos. Partiendo de una PCR de alta fidelidad y tomando como base la bibliografía consultada acerca de la fidelidad y la tasa de mutación de las DNA polimerasas, se llevó a cabo el estudio de las diferentes condiciones mutagénicas que se podían emplear (Goodman et al. 1983, El-Deiry et al. 1984, Leung et al. 1989, Eckert and Kunkel 1990, Cadwell and Joyce 1992, 1994). Estas condiciones se ensayaron utilizando 3 moldes de DNA diferentes (ver apartado 3.2.4 para más detalles):

- 1) Población heterogénea de moléculas de DNA: población combinatorial inicial M1-40, de 76 nt de longitud.
- 2) Secuencia R5-26: molécula de DNA de secuencia concreta y 76 nt.
- 3) Secuencia NS2 de DNA, de 599 nt.

La tasa de mutación asociada al proceso se calculó comparando las secuencias obtenidas, en un mínimo de 10 clones moleculares por cada condición ensayada, y contando el número de posiciones mutadas en alguna de las secuencias clonales respecto al número total de nucleótidos que no formaban parte de la región complementaria a los cebadores (40 nt para R5-26 y 559 nt para NS2). Tanto para R5-26 como para NS2 se realizó, además, el clonaje molecular de los controles positivos previo a los ensayos mutagénicos (Tablas A1 y A2 del Apéndice II, respectivamente), en los que se demostró la fidelidad basal de la enzima en las condiciones de partida empleadas (que se pudo calcular como un valor máximo, puesto que no se observaron mutaciones en ninguna de las secuencias analizadas). Respecto a M1-40, no se calculó la tasa de mutación asociada a su amplificación ya que se trata de una población de secuencias heterogéneas utilizada únicamente como control de la eficiencia de la amplificación por PCR.

4.2.1. PCR mutagénica por desbalance en la concentración de nucleótidos en la mezcla de reacción

El primer conjunto de ensayos para conseguir una PCR mutagénica se realizó alterando las concentraciones relativas de los dNTPs en la mezcla de reacción. Aunque en la bibliografía se han mostrado diferentes métodos para la introducción de desbalances de nucleótidos (Goodman et al. 1983, El-Deiry et al. 1984, Leung et al. 1989, Eckert and Kunkel 1990, Cadwell and Joyce 1992, 1994, Kuipers 1996), en este trabajo se optó por la variación de las concentraciones de A y T respecto a G y C, según se indica en el apartado 3.2.4.1. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

4.2.1.1. Disminución de la concentración relativa de A y T respecto a G y C en la mezcla de reacción de la PCR.

Los resultados obtenidos en la amplificación mediante PCR disminuyendo el porcentaje de dATP y dTTP respecto a dGTP y dCTP en la mezcla de reacción se muestran en la Figura R3.

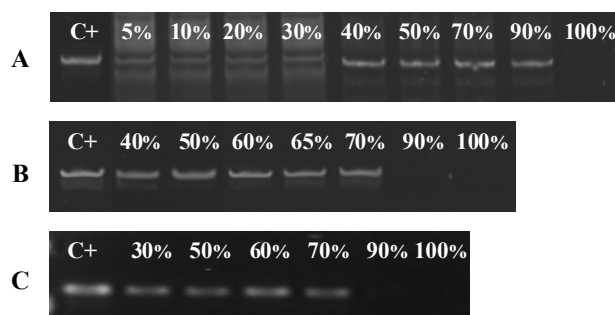


Figura R3. Visualización mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (A y B) o de agarosa al 3% (C), en condiciones nativas, del resultado de la amplificación mediante PCRs mutagénicas con disminución de la proporción de A y T respecto de G y C en la mezcla de reacción. El porcentaje de reducción de A y T en cada PCR se indica en el carril correspondiente. A) Resultados de la amplificación con desbalance de nucleótidos para la población heterogénea M1-40. B) Resultados de las PCRs para la secuencia de DNA molde R5-26. C) Resultados de las PCRs para la secuencia de DNA molde NS2.

Una vez amplificados los diferentes moldes de DNA, se realizó el clonaje molecular de los productos de PCR de R5-26 y NS2 en los que hubo amplificación (con excepción de las desproporciones del 65% para R5-26 y desproporción del 60% para NS2). Con las secuencias clonales obtenidas se calcularon las tasas de mutación de las PCRs ensayadas. Los resultados se

4. RESULTADOS

muestran en la Tabla R2. Las secuencias clonadas y sus alineamientos mediante ClustalW se muestran en las Tablas A3 (molde R5-26) y A4 (molde NS2) del Apéndice II.

Tabla R2. Tasas de mutación (expresadas como número de sustituciones por nucleótido) obtenidas en las PCRs mutagénicas ensayadas reduciendo la proporción de los desoxinucleótidos de A y T respecto a los de G y C en la mezcla de reacción. El color verde en las celdas indica que las PCRs fueron positivas (hubo amplificación), el color rojo que fueron negativas (no se produjo amplificación), y el blanco que dichas PCRs no se realizaron. El valor indicado en cada caso corresponde a la tasa de mutación calculada para las muestras de las que se realizó clonaje molecular. Los valores indicados como $<2,5 \times 10^{-2}$ para R5-26 y $<1,79 \times 10^{-3}$ para NS2 responden al hecho de que no se encontró ninguna mutación en las secuencias analizadas, lo que implica una tasa de mutación menor de 1/40 para R5-26 y menor de 1/559 para NS2.

	PORCENTAJE A-T REDUCIDO RESPECTO A PCR ESTÁNDAR									
	0 (C+)	5, 10, 20	30	40	50	60	65	70	90	100
M1-40										
R5-26	$<2,5 \times 10^{-2}$			$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$		$2,5 \times 10^{-2}$		
NS2	$<1,79 \times 10^{-3}$		$1,79 \times 10^{-3}$		$<1,79 \times 10^{-3}$			$<1,79 \times 10^{-3}$		

4.2.1.2. Aumento de la concentración relativa de A y T respecto a G y C en la mezcla de reacción de la PCR.

Una vez analizados los resultados obtenidos en la amplificación mediante PCR disminuyendo el porcentaje de los dNTPs de A y T respecto a los de G y C, se estudiaron los correspondientes a la desproporción inversa, es decir, aumento de A y T respecto de G y C. Las electroforesis correspondientes a las PCRs ensayadas se muestran en la Figura R4.

4. RESULTADOS

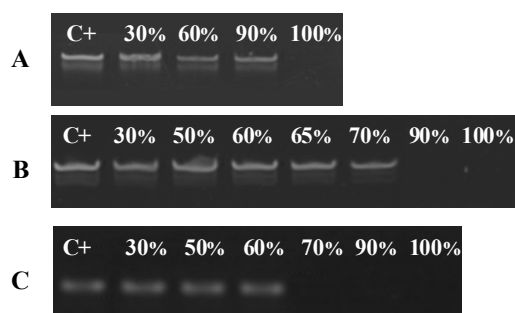


Figura R4. Visualización mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (A y B) o de agarosa al 3% (C), en condiciones nativas, de las PCRs mutagénicas con aumento de la proporción de A y T respecto de G y C en la mezcla de reacción. El porcentaje de incremento de A y T en cada PCR se indica en el carril correspondiente. A) Resultados de la amplificación con la población heterogénea M1-40. B) Resultados obtenidos para la secuencia R5-26. C) Resultados de las PCRs para la secuencia NS2.

A partir de estas PCRs mutagénicas se realizó el clonaje molecular y secuenciación de los productos obtenidos con los moldes R5-26 y NS2. Las tasas de mutación calculadas a partir de estas secuencias se muestran en la Tabla R3. Las secuencias clonadas y sus alineamientos mediante ClustalW se muestran en las Tablas A5 (para R5-26) y A6 (NS2) del Apéndice II.

Tabla R3. Tasas de mutación obtenidas en las PCRs mutagénicas ensayadas aumentando la proporción de los nucleótidos A y T respecto a G y C en la mezcla de reacción. Ver detalles en la leyenda de la Tabla R2.

	PORCENTAJE A-T AUMENTADO RESPECTO A PCR ESTÁNDAR							
	0 (C+)	30	50	60	65	70	90	100
M1-40								
R5-26	$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$		$<2,5 \times 10^{-2}$		
NS2	$<1,79 \times 10^{-3}$	$1,79 \times 10^{-3}$	$<1,79 \times 10^{-3}$	$<1,79 \times 10^{-3}$				

4.2.2. PCR mutagénica por aumento de la concentración de magnesio en la mezcla de reacción

Se ensayó también el aumento en la concentración de Mg^{2+} en la mezcla de reacción de PCR, partiendo de una PCR de alta fidelidad (con una concentración final de $MgCl_2$ de 1,5 mM) y sin desbalance de nucleótidos. Los resultados se muestran en la Figura R5.

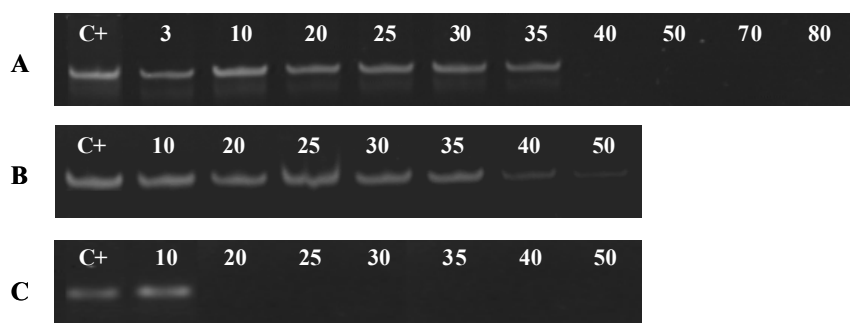


Figura R5. Visualización mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (A y B) o de agarosa al 3% (C), en condiciones nativas, del resultado de las PCRs mutagénicas con aumento de la concentración de Mg^{2+} en la mezcla de reacción. La concentración final (mM) de $MgCl_2$ de cada PCR se indica en el carril correspondiente. El control positivo (C+) corresponde a una concentración final de $MgCl_2$ de 1,5 mM. Se muestran los resultados de la amplificación de la población heterogénea M1-40 (A), la secuencia R5-26 (B) y la secuencia NS2 (C).

A partir de cada una de las amplificaciones por PCR de R5-26 y de NS2 que fueron positivas se realizó clonaje molecular y secuenciación para determinar la tasa de mutación inducida por cada concentración de $MgCl_2$ utilizada. Estos valores se muestran en la Tabla R4. Por su parte, las secuencias obtenidas en el clonaje de cada una de las PCRs positivas se muestran en las Tablas A7 (para R5-26) y A8 (NS2) del Apéndice II, alineadas mediante ClustalW.

4. RESULTADOS

Tabla R4. Tasas de mutación obtenidas en las PCRs mutagénicas ensayadas aumentando la concentración de MgCl_2 en la mezcla de reacción. Ver detalles en la leyenda de la Tabla R2.

	CONCENTRACIÓN FINAL DE MgCl_2 EN LA PCR (mM)									
	1,5 (C+)	3	10	20	25	30	35	40	50	70 80
M1-40										
R5-26	$<2,5 \times 10^{-2}$		$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$	$<2,5 \times 10^{-2}$	
NS2	$<1,79 \times 10^{-3}$		$1,79 \times 10^{-3}$							

4.2.3. PCR mutagénica por adición del catión manganeso a la mezcla de reacción

Otra de las modificaciones introducidas para conseguir una PCR mutagénica fue la adición de concentraciones crecientes de Mn^{2+} en forma de MnCl_2 a la mezcla de reacción, manteniendo la concentración final de MgCl_2 en 1,5 mM (Goodman et al. 1983, El-Deiry et al. 1984, Leung et al. 1989, Eckert and Kunkel 1990, Cadwell and Joyce 1992, 1994). Los resultados de estas amplificaciones se muestran en la Figura R6.

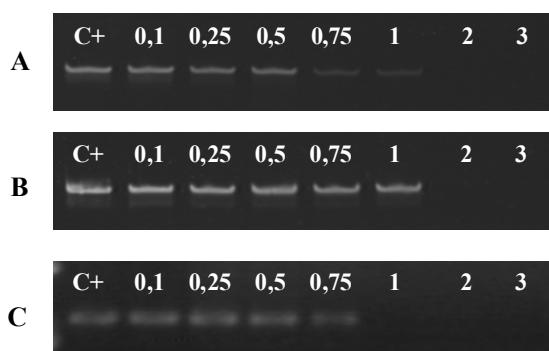


Figura R6. Visualización mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (A y B) o de agarosa al 3% (parte C), en condiciones nativas, de los resultados de las PCRs mutagénicas con adición de diferentes concentraciones de Mn^{2+} en la mezcla de reacción. La concentración final (mM) de MnCl_2 de cada PCR ensayada se indica en el carril correspondiente. El control positivo no incluía MnCl_2 en la mezcla de reacción. Se muestran los resultados de la amplificación mutagénica con la población heterogénea M1-40 (A), con la secuencia R5-26 (B) y con la secuencia NS2 (C).

4. RESULTADOS

A partir de estos resultados se realizó el clonaje molecular de las PCRs mutagénicas obtenidas con 0,1, 0,5 y 1 mM final de MnCl_2 en la mezcla de reacción del molde R5-26, y de 0,1, 0,5 y 0,75 mM de MnCl_2 final para el caso de NS2. Partiendo de las secuencias clonales se obtuvieron las tasas de mutación mostradas en la Tabla R5. Estas secuencias, alineadas utilizando ClustalW, se muestran en las Tablas A9 (para el molde R5-26) y A10 (NS2) del Apéndice II.

Tabla R5. Tasas de mutación obtenidas mediante PCRs mutagénicas con adición de MnCl_2 a la mezcla de reacción. Ver detalles en la leyenda de la Tabla R2.

	CONCENTRACIÓN FINAL DE MnCl_2 EN LA PCR (mM)						
	0 (C+)	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2 3
M1-40							
R5-26	$<2,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-1}		$2,25 \times 10^{-2}$		$2,75 \times 10^{-1}$	
NS2	$<1,79 \times 10^{-3}$	$1,43 \times 10^{-2}$		$1,13 \times 10^{-1}$	$1,41 \times 10^{-1}$		

4.3. SELECCIÓN *IN VITRO* DE APTÁMEROS DE DNA ESPECÍFICOS DE Ebp1

En el proceso de selección *in vitro* de DNA (DS) se realizaron 8 rondas de selección con moléculas de ssDNA frente a Ebp1, siguiendo un esquema como el mostrado en la Figura I5. La correcta amplificación mediante PCR de alta fidelidad y posterior digestión con enzima DNA exonucleasa λ (para obtener ssDNA a partir del dsDNA de las PCRs) de cada una de las rondas se comprobó mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% antes de su utilización para la siguiente ronda de selección (Figura R7).

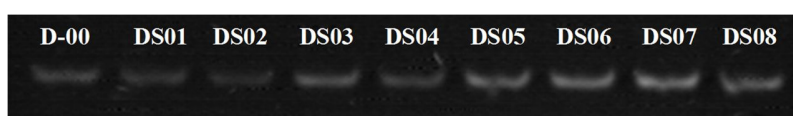


Figura R7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes para la visualización del ssDNA de la población inicial de DNA (indicada como D-00) y de las rondas de selección de DNA 1 a 8 (DS01 a DS08). Las cantidades corresponden a 5 μ l del ssDNA obtenido por digestión con DNA exonucleasa λ de la PCR con la que se había amplificado el ssDNA recuperado en cada ronda de selección. En el caso de la población inicial, la cantidad de ssDNA cargada en el gel de electroforesis fue de 500 ng.

Una vez finalizadas las 8 rondas de selección, se utilizó el DNA obtenido en cada una de ellas para llevar a cabo el proceso de clonaje molecular y secuenciación. El análisis de las secuencias se realizó mediante los programas Chromas Lite (comprobación de las secuencias obtenidas), Seqman (realización de un *contig* con las secuencias de cada clon molecular) y ClustalW (alineamiento de secuencias). En el alineamiento (Tabla A1 del Apéndice III), editado con GeneDoc v2.7, se comprueba que se obtuvieron secuencias repetidas intra-ronda (secuencias idénticas pertenecientes a la misma ronda de selección) (Tabla R6), pero no en el caso de la comparación inter-ronda.

4. RESULTADOS

Tabla R6. Secuencias repetidas dentro de la misma ronda en el proceso de selección *in vitro* de aptámeros de DNA (DS) contra Ebp1. D-00 se refiere a la población inicial (ver apartado 4.1). Las secuencias repetidas se muestran entre paréntesis. Así, por ejemplo, para D-00 (12; 26), (13; 24) indica que las secuencias 12 y 26 son idénticas entre sí, pero diferentes al par formado 13 y 24 (cuyas secuencias son, a su vez, iguales entre sí). No se observaron secuencias repetidas entre diferentes rondas.

Secuencias repetidas intra-ronda	
D-00	(12; 26), (13; 24), (14; 30)
DS01	(01; 27)
DS02	(08; 23), (04; 10; 27), (11; 32), (29; 30)
DS03	(17; 28), (22; 26)
DS04	(16; 17)
DS05	
DS06	
DS07	(07; 08)
DS08	

A partir de las secuencias obtenidas también se analizó la composición nucleotídica en su conjunto (Figura R8) y por posición dentro de la secuencia variable (Figuras A1-A8 del Apéndice III) a lo largo del proceso. No se observó un cambio de tendencia en cuanto a la predominancia de T en la población inicial ni una preferencia clara por alguno de los cuatro nucleótidos respecto de los otros en determinadas posiciones de la secuencia con el avance de las rondas, excepto una tendencia a la disminución de la presencia de A en la posición 40 de la región variable.

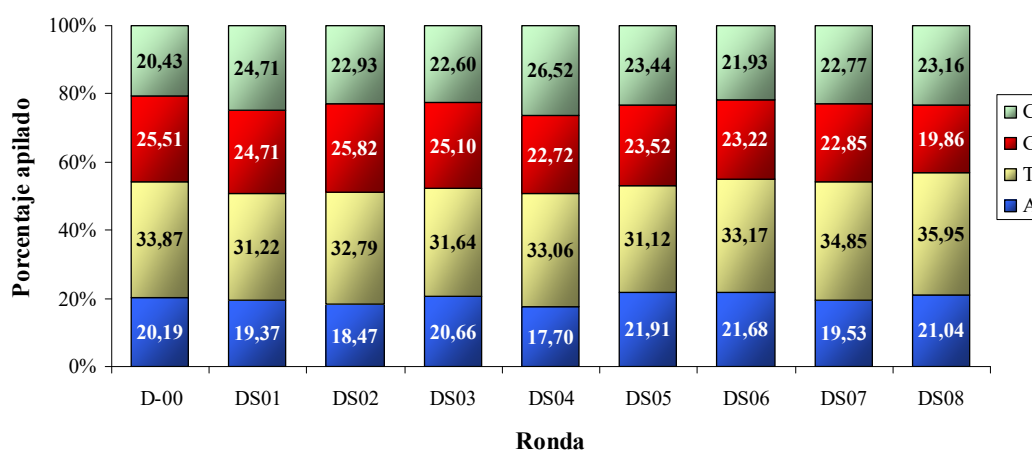


Figura R8. Porcentaje apilado de la frecuencia de aparición de cada nucleótido dentro de la secuencia variable (de 40 nt) de las rondas del proceso de selección de aptámeros de DNA contra Ebp1. Se muestran tanto la población inicial (D-00) como las 8 rondas de selección efectuadas (DS01-DS08). Se observa la predominancia del nucleótido T sobre el resto de nucleótidos a lo largo de todo el proceso. En cuanto al ratio $(A+T) / (G+C)$ a lo largo del mismo, el resultado es el siguiente: D-00: 54,06 / 45,94; DS01: 50,58 / 49,42; DS02: 51,25 / 48,75; DS03: 52,30 / 47,70; DS04: 50,77 / 49,23; DS05: 53,03 / 46,97; DS06: 54,85 / 45,15; DS07: 54,38 / 45,62; DS08: 56,99 / 43,01.

4.4. SELECCIÓN *IN VITRO* DE APTÁMEROS DE RNA ESPECÍFICOS DE Ebp1

En el proceso de selección *in vitro* de RNA se realizaron 8 rondas (siguiendo un esquema como el mostrado en la Figura I6) cuyas poblaciones fueron clonadas y secuenciadas. La correcta retrotranscripción *in vitro*, amplificación mediante PCR de alta fidelidad, y posterior transcripción *in vitro* de cada una de las rondas de RNA se comprobó mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% antes de su utilización para la siguiente ronda de selección (Figura R9).

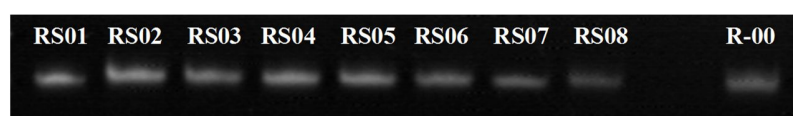


Figura R9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes para la visualización del RNA de la población inicial (R-00, carril de la derecha) y de las rondas de selección de RNA (RS01 a RS08). Las cantidades corresponden a 5 µl del RNA obtenido por transcripción *in vitro* de la PCR de amplificación del ssDNA (procedente a su vez de la retrotranscripción del RNA recuperado en cada ronda). En el caso de la población inicial, la cantidad de RNA cargada en el gel de electroforesis fue de 1 µg.

El análisis de las secuencias obtenidas mediante clonaje molecular mostró la presencia de numerosos grupos de secuencias repetidas dentro de la misma ronda de selección (Tabla R7, y Tabla A2 del Apéndice III), pero no entre diferentes rondas.

Tabla R7. Secuencias repetidas dentro de la misma ronda de selección *in vitro* de aptámeros de RNA (RS) contra Ebp1. R-00 se refiere a la población inicial. Las secuencias repetidas se muestran entre paréntesis, empleando el criterio indicado en la leyenda de la Tabla R6. No se observaron secuencias repetidas entre diferentes rondas.

Secuencias repetidas intra-ronda	
R-00	(12; 26), (13; 24), (14; 30)
RS01	
RS02	(11; 23)
RS03	(17; 33), (18; 19; 20; 23; 25; 27), (22; 24; 28), (26; 34), (29; 30), (35; 36)
RS04	(05; 06)
RS05	(03; 26), (04; 05; 16), (06; 08; 11; 13), (07; 15), (14; 20), (17; 18)
RS06	(02; 04), (03; 10), (20; 24; 27; 28; 29; 32), (21; 25; 26), (22; 35; 39), (23; 34), (37; 41)
RS07	(02; 09), (03; 04; 12), (06; 07; 10), (14; 15; 18), (16; 17), (29; 30)
RS08	(01; 02; 11), (04; 10), (08; 16; 22), (12; 20), (14; 17)

En cuanto a la composición nucleotídica global, no se observó un cambio de tendencia en ella (Figura R10), pero sí una preferencia e imposición del nucleótido G en la posición 40 de la región variable acompañada de una disminución de A en las posiciones 36 a 39 de dicha región, con ausencia de la misma en las posiciones 38 y 39 en las dos últimas rondas (Figuras A9-A16 del Apéndice III).

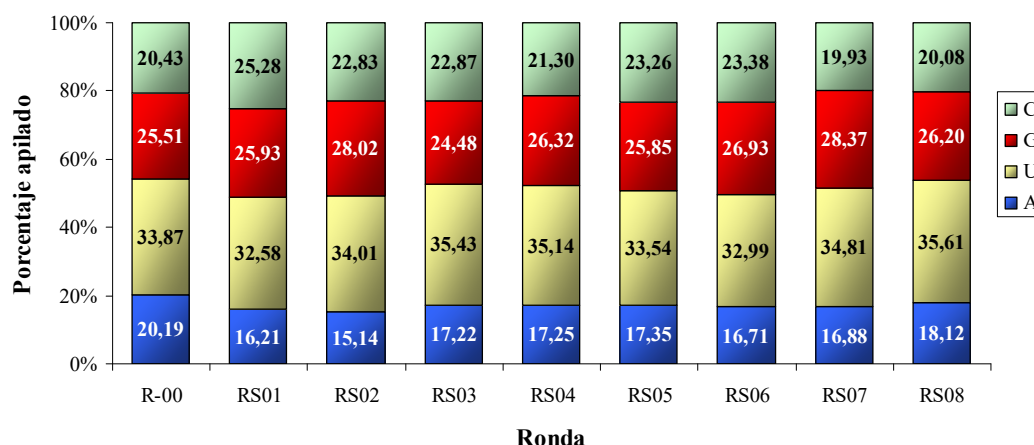


Figura R10. Porcentaje apilado de la frecuencia de aparición de cada nucleótido dentro de la secuencia variable (de 40 nt) de las rondas del proceso de selección de aptámeros de RNA contra Ebp1. Se muestran tanto la población inicial (R-00) como las 8 rondas de selección efectuadas (RS01-RS08). Se observa la predominancia del nucleótido U sobre el resto de nucleótidos a lo largo de todo el proceso. En cuanto al ratio $(A+U) / (G+C)$ a lo largo del mismo, el resultado es el siguiente: R-00: 54,06 / 45,94; RS01: 48,79 / 51,21; RS02: 49,15 / 50,85; RS03: 52,65 / 47,35; RS04: 52,38 / 47,62; RS05: 50,89 / 49,11; RS06: 49,7 / 50,3; RS07: 51,69 / 48,31; RS08: 53,73 / 46,27.

4.5. EVOLUCIÓN *IN VITRO* DE APTÁMEROS DE DNA ESPECÍFICOS DE Ebp1

La obtención de aptámeros de DNA mediante un proceso de evolución *in vitro* (DE) implicó 8 rondas de selección y amplificación mutagénica (introduciendo una concentración 0,5 mM de $MnCl_2$ en la mezcla de reacción de la PCR) (Figura I5). El dsDNA obtenido (de la amplificación mutagénica del ssDNA recuperado) fue digerido a ssDNA mediante la enzima DNA exonucleasa λ . Antes de su utilización para la siguiente ronda de selección, el ssDNA fue comprobado mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% (Figura R11).

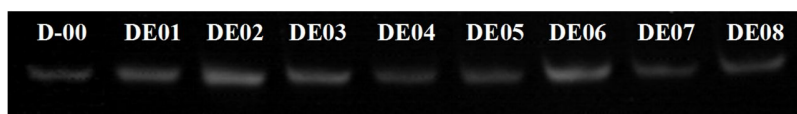


Figura R11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes para la visualización del ssDNA de la población inicial (D-00) y de las rondas de evolución de DNA (DE01 a DE08). Las cantidades corresponden a 5 μ l del ssDNA obtenido mediante PCR mutagénica del ssDNA recuperado seguido de digestión con DNA exonucleasa λ . En el caso de la población inicial, la cantidad de ssDNA cargada en el gel de electroforesis fue de 500 ng.

Las 8 poblaciones obtenidas durante el proceso DE fueron también amplificadas mediante PCRs de alta fidelidad para llevar a cabo su clonaje molecular y su secuenciación. En el alineamiento de las secuencias obtenidas no se encontró ninguna secuencia mantenida a lo largo del proceso (Tabla A3 del Apéndice III), pero sí secuencias repetidas intra-ronda (Tabla R8).

Tabla R8. Secuencias repetidas dentro de la misma ronda de selección en el proceso de evolución *in vitro* de aptámeros de DNA (DE) contra Ebp1. D-00 se refiere a la población inicial. Las secuencias repetidas se muestran entre paréntesis, empleando el criterio indicado en la leyenda de la Tabla R6. No se observaron secuencias repetidas entre diferentes rondas.

Secuencias repetidas intra-ronda	
D-00	(12; 26), (13; 24), (14; 30)
DE01	
DE02	
DE03	
DE04	(06; 08)
DE05	(04; 06), (11; 12), (13; 20)
DE06	(04; 22)
DE07	(08; 23)
DE08	(19; 24), (21; 23)

Se analizó en cada ronda la composición de nucleótidos en su conjunto (Figura R12), comprobando la predominancia del nucleótido T en todas ellas. También se analizó la presencia de cada nucleótido por posición variable de secuencia a lo largo del proceso (Figuras A17-A24 del Apéndice III), donde no se observó la imposición de alguno de los nucleótidos en concreto con respecto a los otros en ninguna de las posiciones de la secuencia durante el proceso.

4. RESULTADOS

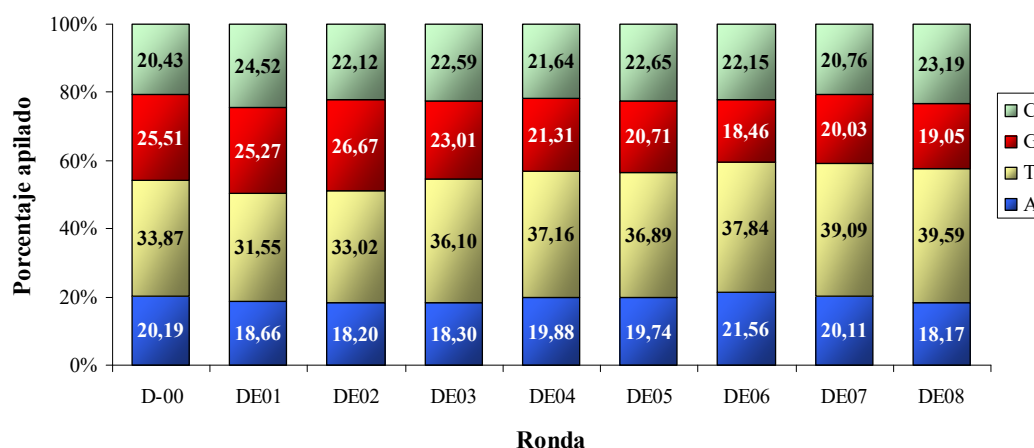


Figura R12. Porcentaje apilado de la frecuencia de aparición de cada nucleótido dentro de la secuencia variable (de 40 nt) de las rondas del proceso de evolución de aptámeros de DNA contra Ebp1. Se muestran tanto la población inicial (D-00) como las 8 rondas de evolución efectuadas (DE01-DE08). En cuanto al ratio (A+T) / (G+C) a lo largo del proceso, el resultado es el siguiente: D-00: 54,06 / 45,94; DE01: 50,21 / 49,79; DE02: 51,22 / 48,78; DE03: 54,4 / 45,6; DE04: 57,04 / 42,96; DE05: 56,63 / 43,37; DE06: 59,4 / 40,6; DE07: 59,2 / 40,8; DE08: 57,76 / 42,24.

4.6. EVOLUCIÓN *IN VITRO* DE APTÁMEROS DE RNA ESPECÍFICOS DE Ebp1

En el proceso de obtención de aptámeros de RNA contra Ebp1 mediante evolución *in vitro* (RE) se realizaron 8 rondas de selección-amplificación mutagénica (Figura I6). El RNA obtenido tras cada paso de selección fue retrotranscrito a ssDNA, este DNA fue amplificado mediante PCR mutagénica (introduciendo una concentración 0,5 mM de MnCl₂ en la mezcla de reacción) y posteriormente se transcribió *in vitro* a RNA para comenzar un nuevo ciclo. El RNA resultante se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes antes de cada ronda (Figura R13).



Figura R13. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes para la visualización del RNA de las rondas 1 a 8 de evolución de RNA (RE01-RE08). Se cargaron 5 μ l del RNA obtenido por transcripción *in vitro* del DNA procedente de la amplificación mutagénica. En el caso de la población inicial (R-00, carril derecho), la cantidad de RNA cargada en el gel de electroforesis fue de 1 μ g.

Además de las PCRs mutagénicas en presencia de 0,5 mM de $MnCl_2$, a partir del RNA retrotranscrito a DNA en cada ronda se realizaron PCRs de alta fidelidad para llevar a cabo el clonaje molecular y secuenciación de las poblaciones de aptámeros obtenidas. En el análisis de las secuencias se obtuvieron secuencias repetidas dentro de cada ronda del proceso (Tabla R9), pero no secuencias mantenidas entre diferentes rondas (alineamiento en la Tabla A4 del Apéndice III).

Tabla R9. Secuencias repetidas dentro de la misma ronda de selección en el proceso de evolución *in vitro* de aptámeros de RNA (RE) contra Ebp1. R-00 se refiere a la población inicial. Las secuencias repetidas se muestran entre paréntesis, empleando el criterio indicado en la leyenda de la Tabla R6. No se observaron secuencias repetidas entre diferentes rondas.

Secuencias repetidas intra-ronda	
R-00	(12; 26), (13; 24), (14; 30)
RE01	(19; 29), (20; 26), (24; 31)
RE02	(04; 08; 17), (09; 11), (10; 18; 23)
RE03	(02; 14), (03; 17), (04; 18), (10; 22), (31; 35)
RE04	(02; 28), (06; 29)
RE05	(07; 21)
RE06	
RE07	
RE08	(09; 18), (10; 13), (24; 30)

A partir de las secuencias obtenidas también se analizó la composición de nucleótidos en el conjunto de cada ronda así como de los nucleótidos por posición variable de secuencia a lo largo del proceso. A nivel global se observó una mayor presencia del nucleótido U a lo largo de todo el proceso (Figura R14). Por su parte, a nivel individual destacó la disminución (e incluso desaparición) del nucleótido A en las posiciones de 36 a 39 de la región variable junto con el aumento e imposición del nucleótido G en la posición 40 de dicha región (Figuras A25-A32 del Apéndice III).

4. RESULTADOS

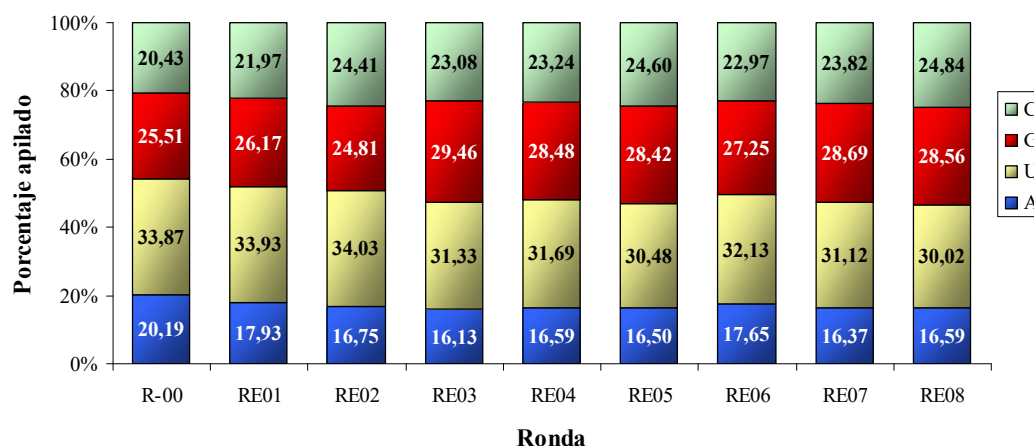


Figura R14. Porcentaje apilado de la frecuencia de aparición de cada nucleótido dentro de la secuencia variable (de 40 nt) de las rondas del proceso de evolución de aptámeros de RNA contra la proteína Ebp1. Se muestran tanto la población inicial (R-00) como las 8 rondas de evolución efectuadas (RE01-RE08). Se observa la predominancia del nucleótido U sobre el resto de nucleótidos a lo largo de todo el proceso. En cuanto al ratio $(A+U) / (G+C)$ a lo largo del mismo, el resultado es el siguiente: *R-00*: 54,06 / 45,94; *RE01*: 51,86 / 48,14; *RE02*: 50,78 / 49,22; *RE03*: 47,46 / 52,54; *RE04*: 48,28 / 51,72; *RE05*: 46,98 / 53,02; *RE06*: 49,78 / 50,22; *RE07*: 47,49 / 52,51; *RE08*: 46,61 / 53,39.

Además de los análisis mencionados en los apartados 4.3 a 4.6, se realizó también el alineamiento con ClustalW de las secuencias derivadas de los cuatro procesos (DS, RS, DE, RE), sin observarse ninguna secuencia mantenida entre ellos (Tabla A5 del Apéndice III). Por otra parte, como se comentó en el apartado 3.2.18 de Materiales y Métodos, se obtuvieron las estructuras secundarias de todas las secuencias mediante los servidores mfold y RNAfold (estructuras *dot-bracket* mostradas en la Tabla A6 del Apéndice III). Las pruebas de afinidad se realizaron con las ocho poblaciones (rondas 1 a 8) resultantes de los cuatro procesos (DS, RS, DE y RE) y, a continuación, con las secuencias clonales obtenidas en la última ronda de cada uno de los cuatro procesos.

4.7. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD POR EBP1 DE LOS APTÁMEROS DE DNA MEDIANTE *SELEX-LIKE BINDING ASSAY* (SELBA) “ESTÁNDAR”

En una primera aproximación para cuantificar la afinidad por la proteína Ebp1 de los aptámeros de DNA obtenidos en los procesos DS y DE, se incubaron 50 pmoles de ssDNA frente a 12,5 pmoles de proteína (relación molar 4:1) durante 1 h, en termobloque a 37°C y 1400 r.p.m., tras una contraselección en las mismas condiciones con resina sin Ebp1 unida para eliminar los falsos positivos. Después de la incubación se realizó un lavado con 1 ml de TS. El ensayo se repitió tres veces, con un lote diferente de aptámeros en el tercero de los ensayos, para cada muestra. Los resultados obtenidos en el proceso DS se muestran en la Figura R15.

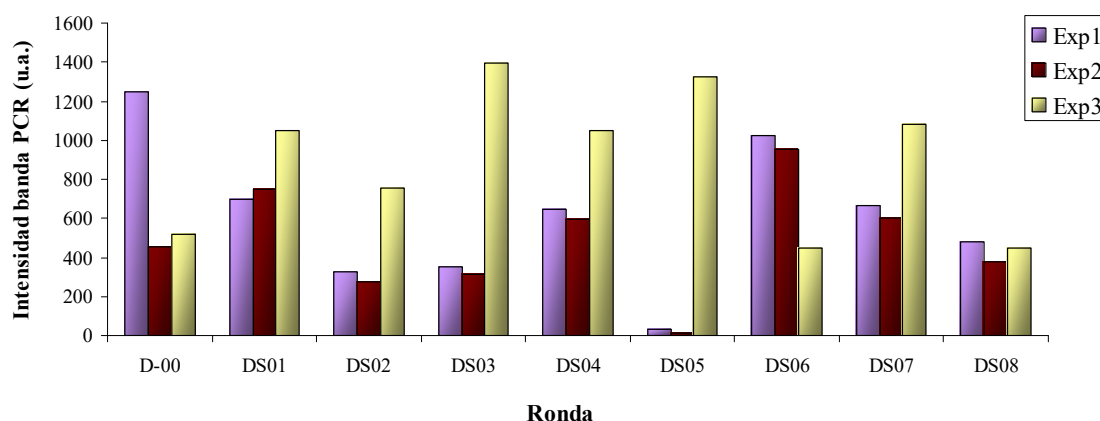


Figura R15. Análisis cuantitativo de la intensidad media (en unidades arbitrarias, u.a.) de la banda de electroforesis (en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones nativas) de la PCR del ssDNA recuperado tras la incubación de 50 pmoles de aptámeros de ssDNA de cada ronda del proceso DS con 12,5 pmoles de Ebp1 (relación 4:1) después de un paso de contraselección. La intensidad corresponde a los resultados de 3 ensayos (Exp1, Exp2 y Exp3), habiéndose realizado el tercero de ellos con un lote de aptámeros nuevo respecto a los otros dos.

Estos mismos ensayos, siguiendo las mismas condiciones, se realizaron también con las rondas del proceso DE. Los resultados de los 3 ensayos de SELBA para DE se muestran en la Figura R16.

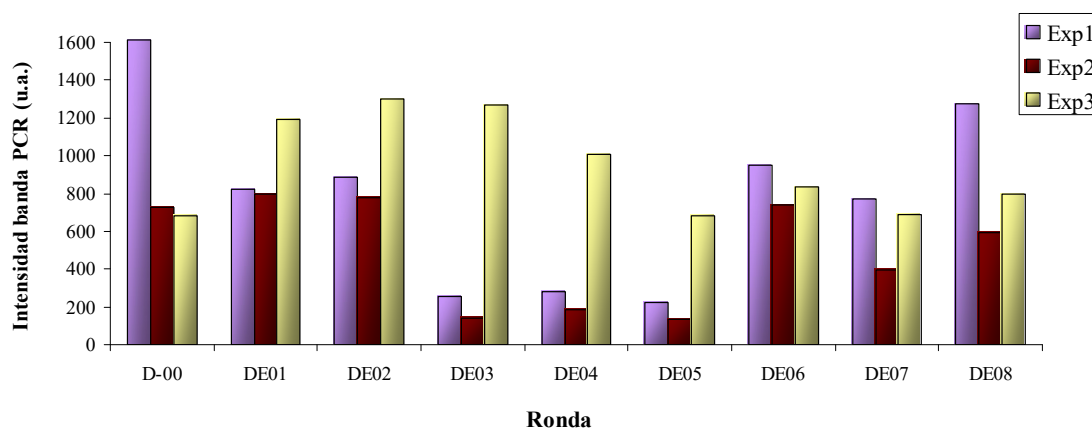


Figura R16. Análisis cuantitativo de la intensidad media (en unidades arbitrarias, u.a.) de la banda de electroforesis (en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones nativas) de la PCR del ssDNA recuperado tras la incubación de 50 pmoles de aptámeros de ssDNA de cada ronda del proceso DE con 12,5 pmoles de Ebp1 (relación 4:1) después de un paso de contraselección. La intensidad corresponde a los resultados de 3 ensayos (Exp1, Exp2 y Exp3), habiéndose realizado el tercero de ellos con un lote de aptámeros nuevo respecto a los otros dos.

4.8. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD POR EBP1 DE LOS APTÁMEROS DE RNA MEDIANTE *SELEX-LIKE BINDING ASSAY* (SELBA) “ESTÁNDAR”

Análogamente a lo descrito en el apartado 4.7, para cuantificar la afinidad por la proteína Ebp1 de los aptámeros de RNA obtenidos en los procesos RS y RE se utilizaron 50 pmoles de RNA frente a 12,5 pmoles de Ebp1 (relación 4:1), con una contraselección previa con resina sin Ebp1. Esta incubación y la correspondiente a la realizada con resina-Ebp1 se efectuaron a 37°C y 1400 r.p.m. durante 1 h. Tras ella, se realizó un lavado con 1 ml de TS. Para el proceso RS, el ensayo se repitió dos veces con lotes de aptámeros diferentes en ambos casos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R17.

4. RESULTADOS

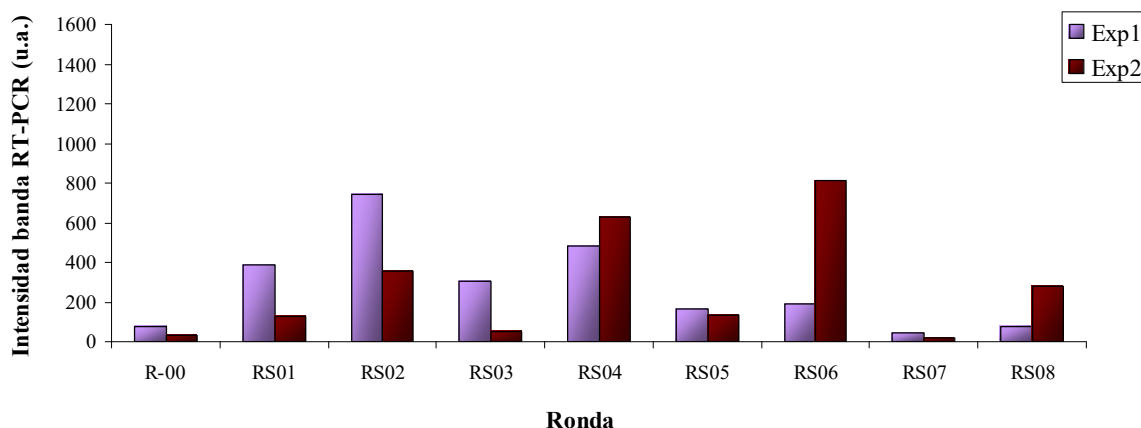


Figura R17. Análisis cuantitativo de la intensidad media (en unidades arbitrarias, u.a.) de la banda de electroforesis (en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones nativas) de la RT-PCR del RNA recuperado tras la incubación de 50 pmoles de aptámeros de RNA de cada ronda del proceso RS con 12,5 pmoles de Ebp1 (relación 4:1) después de un paso de contraselección. La intensidad corresponde a los resultados de 2 ensayos (Exp1 y Exp2) realizados con diferente material de partida.

Al igual que para RS, también se realizaron pruebas de SELBA con las 8 rondas del proceso RE con 2 ensayos (utilizando lotes de aptámeros diferentes) para cada uno de ellos. Los resultados se muestran en la Figura R18.

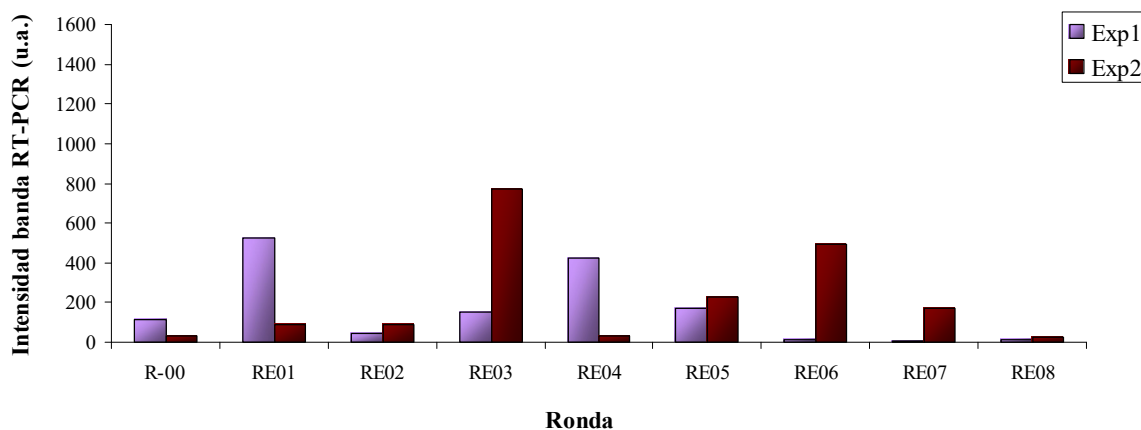


Figura R18. Análisis cuantitativo de la intensidad media (en unidades arbitrarias, u.a.) de la banda de electroforesis (en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones nativas) de la RT-PCR del RNA recuperado tras la incubación de 50 pmoles de aptámeros de RNA de cada ronda del proceso RE con 12,5 pmoles de Ebp1 (relación 4:1) después de un paso de contraselección. La intensidad se corresponde a los resultados de 2 ensayos (Exp1 y Exp2) realizados con diferente material de partida.

Dada la falta de reproducibilidad de los experimentos mostrados en los apartados 4.7 y 4.8, se decidió no proseguir con el uso de la técnica SELBA “estándar” y determinar la afinidad de los aptámeros mediante otro tipo de ensayos.

4.9. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD POR EBP1 DE LOS APTÁMEROS DE RNA MEDIANTE *SELEX-LIKE BINDING ASSAY* (SELBA) DE AFINIDAD

Como segunda aproximación experimental para la determinación de la afinidad por la proteína Ebp1 de las poblaciones obtenidas en las distintas rondas de los cuatro procesos, se utilizó una variante del SELBA en la que se añadieron cantidades crecientes de aptámeros frente a una determinada cantidad de Ebp1. En ella, era de esperar que las rondas con mayor afinidad mostrasen un resultado positivo (en la amplificación mediante RT-PCR) a menor concentración de aptámeros que las rondas menos afines. Un ejemplo de los resultados obtenidos (concretamente, para la última ronda del proceso RS) se muestra en la Figura R19.

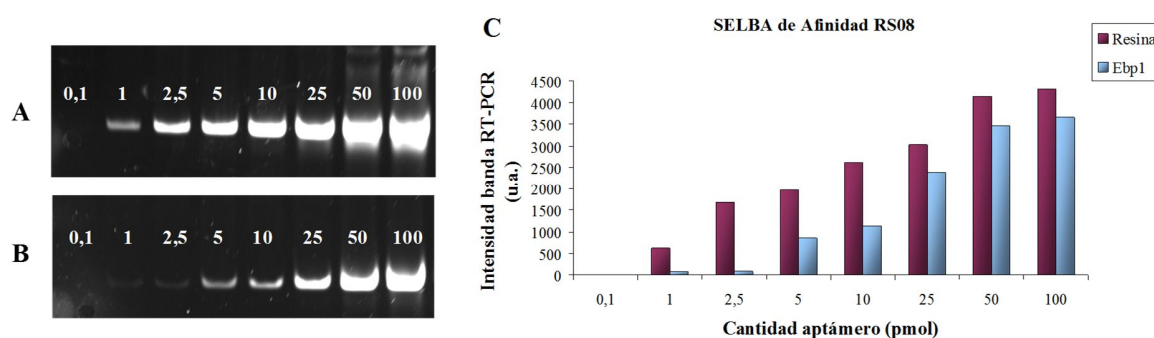


Figura R19. Resultado del SELBA de afinidad realizado con la ronda número 8 del proceso RS: (A) RT-PCR de la incubación negativa, utilizando resina no unida a Ebp1, con cantidades crecientes de aptámeros (indicados en pmoles); (B) RT-PCR de la incubación con Ebp1 utilizando las mismas cantidades de aptámeros; (C) representación gráfica de las cuantificaciones de la intensidad de banda (obtenidas utilizando GelAnalyzer) de los geles (de poliacrilamida al 10%, en condiciones nativas) A y B medida en unidades arbitrarias (u.a.).

El resultado de un ensayo equivalente para las diferentes rondas de los procesos RS y RE se muestra en las Figuras R20 y R21. La Figura R21 muestra los resultados de las rondas de RE, si bien en este caso no se analizaron las rondas RE05, RE06 ni RE07.

4. RESULTADOS

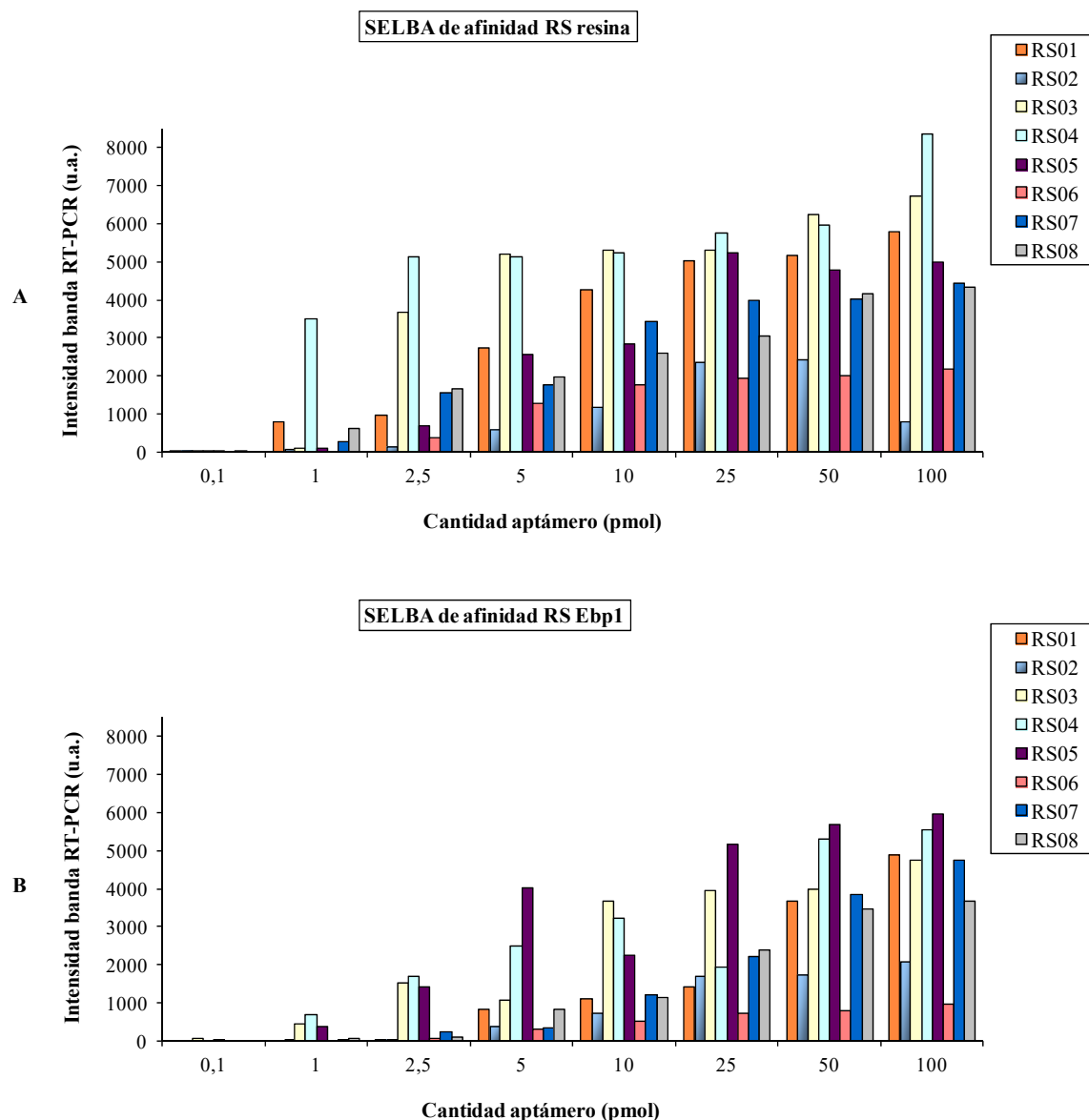


Figura R20. Análisis cuantitativo (en unidades arbitrarias, u.a.) de los SELBA de afinidad del proceso RS. Las intensidades de las bandas de electroforesis (en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones nativas) de las RT-PCRs se midieron utilizando el *software* GelAnalyzer. A) Intensidad correspondiente a los controles negativos (incubación con resina, sin Ebp1) de las diferentes rondas con cantidades crecientes de aptámeros. B) Intensidad correspondiente a la incubación con Ebp1.

4. RESULTADOS

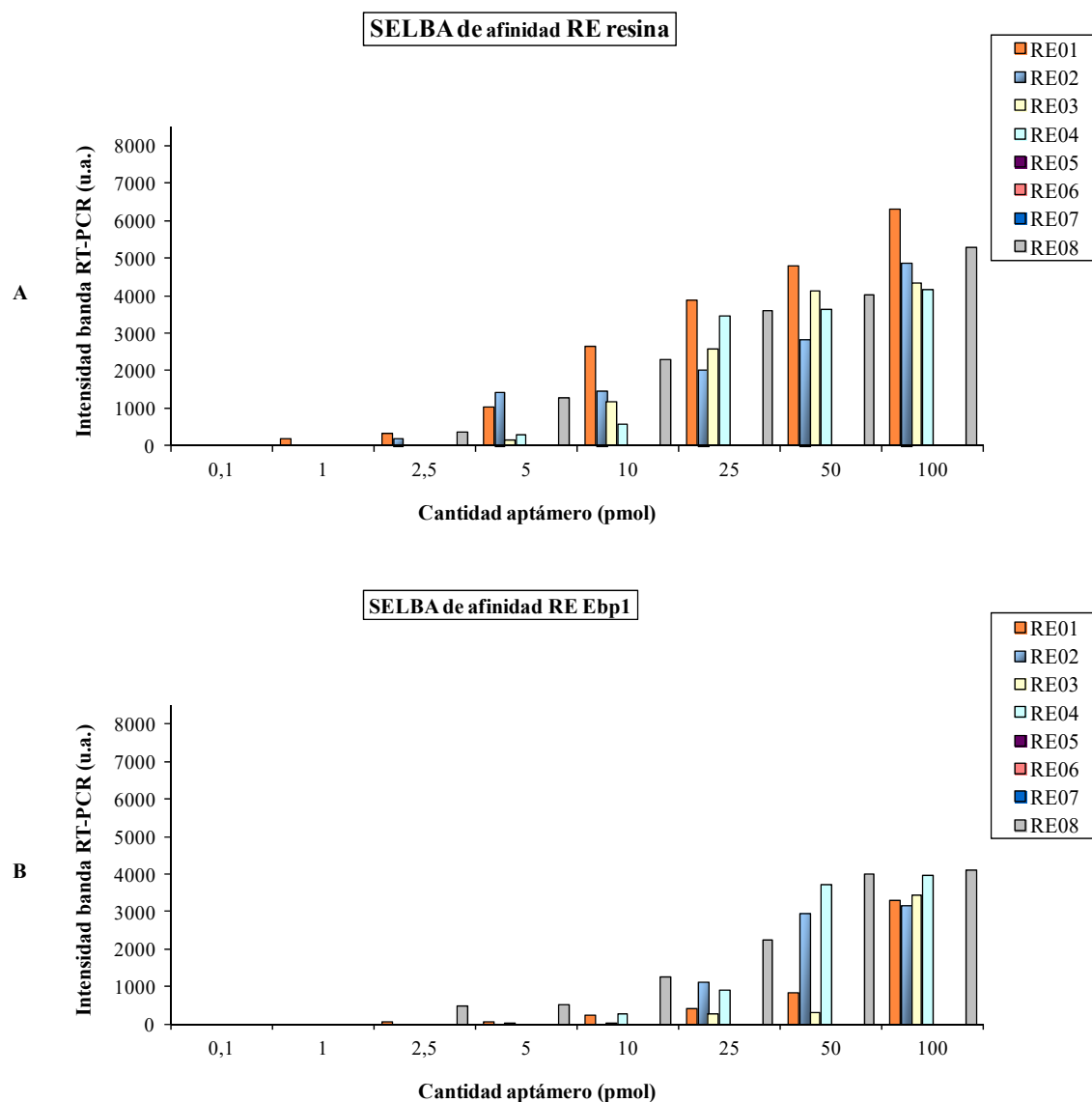


Figura R21. Análisis cuantitativo (en unidades arbitrarias, u.a.) de los SELBA de afinidad del proceso RE (las rondas RE05, RE06 y RE07 no se analizaron: por analogía a la Figura R20 se muestran sus nombres en la leyenda, pero no aparecen sus datos en la gráfica). Estas intensidades se midieron en las electroforesis (en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones nativas) de las RT-PCRs utilizando el *software* GelAnalyzer. A) Intensidad correspondiente a los controles negativos (incubación con resina, sin Ebp1) de las diferentes rondas con cantidades crecientes de aptámeros. B) Intensidad correspondiente a la incubación con Ebp1.

Como se observa en las Figuras R19-R21, el ensayo de las diferentes rondas mostró que la intensidad de banda en la incubación negativa (sin Ebp1) de la población de aptámeros era, por lo general, mayor que la correspondiente a la incubación en presencia de Ebp1. Como consecuencia de

estos resultados, poco informativos y escasamente reproducibles, se decidió determinar la afinidad de los aptámeros poniendo a punto una técnica alternativa y novedosa.

4.10. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD APTÁMERO-EBP1 MEDIANTE *ENZYME-LINKED OLIGONUCLEOTIDE ASSAY* (ELONA) ACOPLADO A PCR O RT-PCR A TIEMPO FINAL

Una vez realizados los ensayos de SELBA (apartados 4.7 a 4.9) y dado que resultaron poco informativos, se decidió poner a punto otros métodos para cuantificar la afinidad de los aptámeros por la proteína Ebp1, concretamente ELONAs acoplados a PCR o a RT-PCR. Cada ensayo de ELONA acoplado a PCR o RT-PCR se realizó por triplicado. A su vez, en cada ensayo se incubaron, por triplicado, 80 nM de aptámeros con Ebp1 (8,54 pmoles/pocillo) o BSA (6 pmoles/pocillo) previamente inmovilizadas (según el protocolo detallado en el apartado 3.2.21), en un volumen final de 200 μ l. Este procedimiento permitió obtener resultados en el caso del DNA (procesos DS y DE), mientras que para RNA no se logró amplificación suficiente mediante RT-PCR como para ser observable por electroforesis en gel. En la Figura R22 se muestra, como ejemplo, uno de los ensayos llevados a cabo por triplicado con la séptima ronda de selección de DNA (DS07).



Figura R22. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas para la visualización del DNA, amplificado mediante PCR, recuperado del ELONA de la ronda 7 de selección de DNA (DS07) frente a Ebp1 y BSA. A partir de geles análogos a éste de cada ronda de los procesos DS y DE se realizó el análisis cuantitativo de las bandas obtenidas.

A partir de las electroforesis se calculó la intensidad de cada banda de PCR utilizando el *software* GelAnalyzer. La Figura R23 muestra las intensidades de la banda de DNA amplificado por PCR tras el ELONA de las rondas de selección de DNA (DS).

4. RESULTADOS

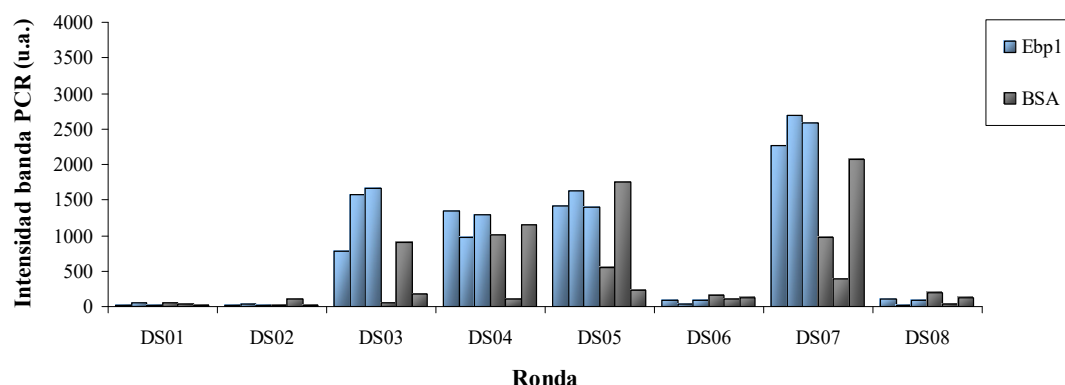


Figura R23. Análisis cuantitativo (en unidades arbitrarias, u.a.) de la intensidad de la banda correspondiente a la electroforesis en gel de acrilamida al 10%, en condiciones nativas, de la PCR del DNA recuperado de los ensayos de ELONA de cada una de las rondas de selección (DS). La PCR se realizó a partir del DNA recuperado en los ELONAs frente a Ebp1 o BSA (en ambos casos, por triplicado), siendo la amplificación teóricamente proporcional a la cantidad de DNA recuperado en el ELONA (y, por tanto, a la afinidad global de la población por la proteína).

Análogamente, también se realizó el análisis del DNA recuperado en los ELONAs de las rondas de DE. El resultado de estos ensayos se muestra en la Figura R24.

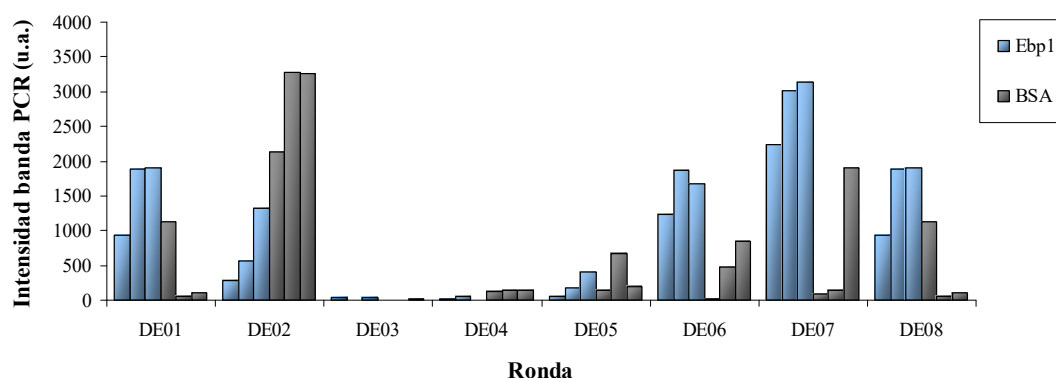


Figura R24. Análisis cuantitativo (en unidades arbitrarias, u.a.) de la intensidad de la banda correspondiente a la electroforesis en gel de acrilamida al 10%, en condiciones nativas, de la PCR del DNA recuperado de los ensayos de ELONA de cada una de las rondas de evolución (DE). La PCR se realizó a partir del DNA recuperado en los ELONAs frente a Ebp1 o BSA (en ambos casos, por triplicado).

La escasa amplificación obtenida para varias de las rondas de los procesos DS y DE, así como la ausencia de la misma para los procesos RS y RE, puso de manifiesto que la PCR y la RT-PCR a tiempo final no ofrecían la sensibilidad suficiente para ser utilizadas en el presente trabajo.

4.11. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS APTÁMEROS DE DNA POR EBP1 MEDIANTE *ENZYME-LINKED OLIGONUCLEOTIDE ASSAY* (ELONA) ACOPLADO A PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR). CARACTERIZACIÓN DE LOS APTÁMEROS DE DNA OBTENIDOS

Dada la escasa reproducibilidad y/o sensibilidad de las técnicas utilizadas hasta ese momento para cuantificar la unión de los aptámeros de DNA y RNA a la proteína Ebp1, se puso a punto la técnica de ELONA acoplado a qPCR (para DNA, en este apartado) y a RT-qPCR (para RNA, en el apartado 4.12).

El ELONA acoplado a qPCR permite la cuantificación del DNA recuperado (Figura R25) mediante la comparación de los valores de Ct de los diferentes ensayos realizados y su interpolación frente a una recta patrón construida a tal efecto (Pinto et al. 2009, Pinto et al. 2014).

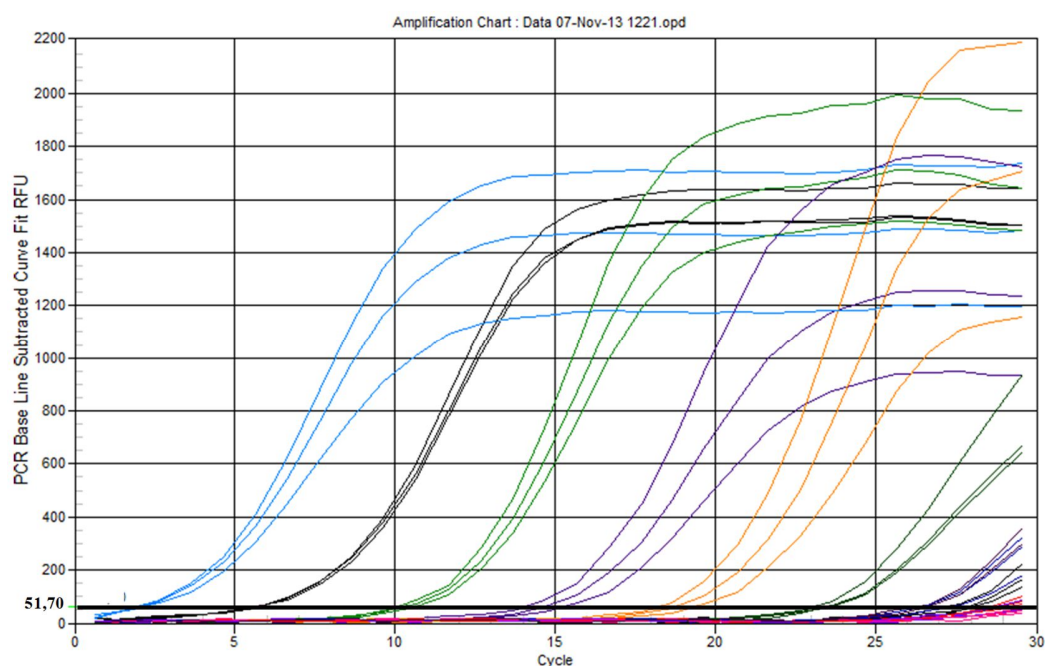


Figura R25. Curvas de amplificación de una qPCR realizada para la obtención de la recta patrón de la Figura R26, analizada con el *software* Bio-Rad iQ5. En la qPCR se establece automáticamente un valor umbral para el incremento de fluorescencia asociada a la amplificación por encima de la línea base, que se considera significativo de amplificación: en este ejemplo el valor umbral resulta 51,70 (señalado en negrita). Una vez determinado dicho valor se obtienen los valores de Ct (*cycle threshold* o ciclo límite) para cada muestra amplificada. El Ct será menor para las muestras que inicialmente tenían mayor cantidad de DNA molde (es decir, las que correspondían a DNA con mayor afinidad por su diana en el proceso de ELONA): en este ejemplo, las muestras (triplicados) con menor Ct se muestran en azul (valor Ct medio = 2,01).

4. RESULTADOS

Para la construcción de la recta patrón se utilizaron, por triplicado, cantidades conocidas de DNA (comprendidas entre $6,25 \times 10^{-1}$ y $6,25 \times 10^{-11}$ pmoles) como molde para realizar su amplificación por qPCR. Se utilizó el *software* BioRad iQ5 para calcular los correspondientes valores de Ct, mostrados en la Tabla R10.

Tabla R10. Resultados de la amplificación mediante qPCR de cantidades conocidas de DNA molde para obtener la recta patrón. En los ensayos con DNA molde inicial comprendido entre $6,25 \times 10^{-8}$ y $6,25 \times 10^{-11}$ pmoles, los valores de Ct obtenidos (no mostrados) se situaron en el rango del control negativo de la amplificación.

DNA molde añadido (pmol)	log pmol	Ct (media, n=3)	Desviación estándar
$6,25 \times 10^{-1}$	-0,20	2,01	0,12
$6,25 \times 10^{-2}$	-1,20	5,69	0,06
$6,25 \times 10^{-3}$	-2,20	10,28	0,31
$6,25 \times 10^{-4}$	-3,20	14,64	0,60
$6,25 \times 10^{-5}$	-4,20	18,76	0,54
$6,25 \times 10^{-6}$	-5,20	23,38	0,27
$6,25 \times 10^{-7}$	-6,20	26,82	0,57
Control negativo	N/A	27,73	0,44

En las condiciones de qPCR ensayadas se obtuvo un valor de Ct de $27,73 \pm 0,44$ para el control negativo (realizado por triplicado), lo que supone un límite de detección de DNA en el ensayo de $6,25 \times 10^{-7}$ pmoles. Los valores de Ct obtenidos para las cantidades de DNA molde comprendidas entre $6,25 \times 10^{-1}$ y $6,25 \times 10^{-7}$ pmoles se ajustaron a la recta patrón: $y = -4,2236x + 0,9805$, con $R^2 = 0,9975$, siendo y el valor de Ct y x el logaritmo de la cantidad de DNA molde de partida (ver Figura R26).

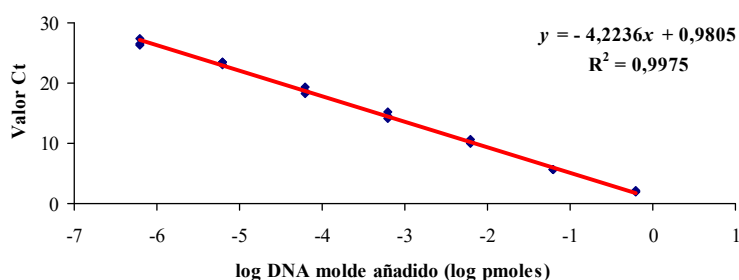


Figura R26. Recta patrón de la qPCR realizada con cantidades decrecientes de DNA. La recta se obtuvo con el programa GraphPad Prism a partir de los valores de Ct calculados por el programa BioRad iQ5, entre $6,25 \times 10^{-1}$ y $6,25 \times 10^{-7}$ pmoles (log pmol comprendido entre -0,20 y -6,20). A partir de esta recta patrón se calculó posteriormente, por interpolación en ella, la cantidad de DNA recuperado en los ELONA-qPCR realizados.

La recta patrón obtenida permitió la cuantificación de los aptámeros de DNA (resultantes de los procesos DS y DE) unidos a Ebp1 en ensayos de ELONA acoplados a qPCR. Para ello, una parte del volumen de aptámeros recuperados del ELONA (5 μ l) se utilizó como molde para la realización de las correspondientes qPCRs. Los valores de Ct medios obtenidos en cada caso fueron interpolados en la recta patrón de la Figura R26, determinando así el valor del logaritmo de la cantidad de DNA recuperado (teniendo en cuenta que para la qPCR se habían utilizado 5 μ l de los 90 μ l recuperados del ELONA). Como ejemplo, en el caso de obtener un valor de Ct en la qPCR de 20, el valor de log pmoles interpolado en la Figura R26 sería -4,50, que equivale a $3,16 \times 10^{-5}$ pmoles añadidos como molde en la qPCR: por lo tanto, la cantidad total de DNA recuperado en el ELONA (unido a Ebp1) sería de $5,69 \times 10^{-4}$ pmoles.

4.11.1. Aplicación del ELONA acoplado a qPCR al análisis de las rondas de selección y evolución de DNA

La población de DNA resultante de cada una de las 8 rondas de selección y evolución (procesos DS y DE) fue sometida a tres experimentos de ELONA en paralelo, cada uno de los cuales contenía a su vez un triplicado de cada muestra, que fue analizada mediante qPCR por duplicado. Con ello, se obtuvo un total de 18 valores de Ct para cada ronda analizada (Figura R27).

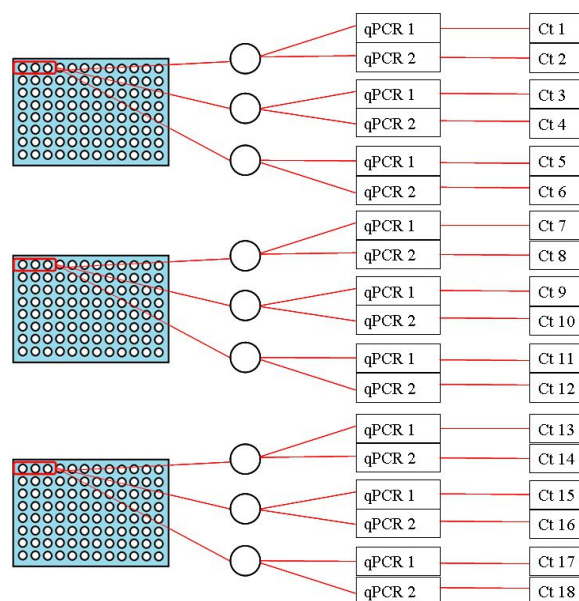


Figura R27. Esquema del proceso seguido en los ensayos de ELONA-qPCR para el cálculo de la afinidad por Ebp1 de los aptámeros de DNA. Se realizaron 3 ELONAs para cada ronda (por triplicado) que fueron analizados por qPCR (por duplicado). Así, el valor medio de Ct (y su desviación estándar) calculado para cada ronda corresponde a un total de 18 amplificaciones.

4. RESULTADOS

El resultado de la determinación de los 18 valores de Ct para cada ronda del proceso DS fue el que se muestra en la Figura R28. En ella se indica el valor promedio de la cantidad de DNA recuperado en cada ronda, con su correspondiente desviación estándar.

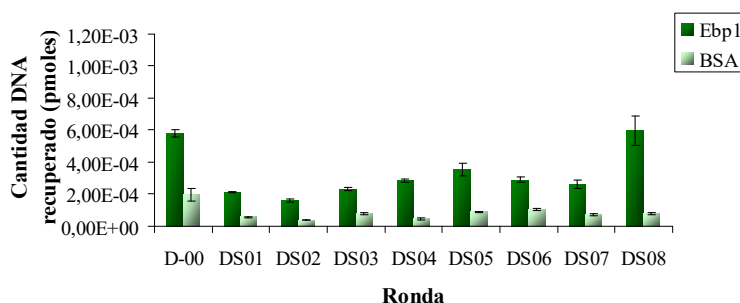


Figura R28. Cantidad de DNA recuperado en los ensayos de ELONA-qPCR frente a Ebp1 (en verde oscuro) o BSA (en verde claro) para la población inicial (D-00) y las 8 rondas de selección de DNA (DS01-DS08). La escala del eje y se ha escogido para que sea la misma que en la Figura R29 y se permita así un análisis comparativo de los dos procesos. Se muestra el valor promedio con su correspondiente desviación estándar. El cálculo se realizó en GraphPad Prism a partir de los valores de Ct determinados por el *software* BioRad iQ5, utilizando la recta patrón mostrada en la Figura R26. La octava ronda mostró claramente una mayor recuperación de DNA (y, por tanto, una mayor afinidad entre la población de aptámeros y Ebp1) respecto de las demás.

Por su parte, el resultado correspondiente al análisis de los 18 valores de Ct de cada ronda del proceso DE se muestra en la Figura R29.

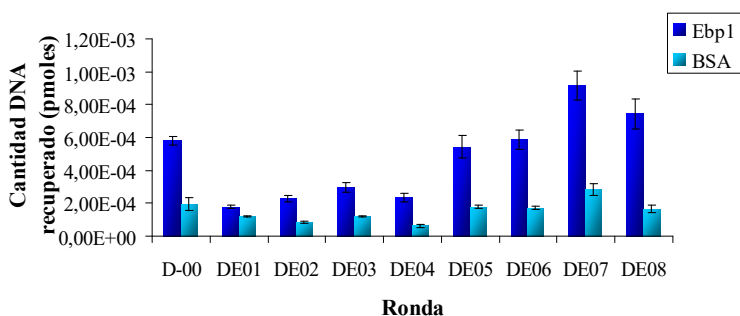


Figura R29. Cantidad de DNA recuperado en los ensayos de ELONA-qPCR frente a Ebp1 (en azul oscuro) o BSA (en azul claro) para la población inicial (D-00) y las 8 rondas de evolución de DNA (DE01-DE08). Se muestra el valor promedio con su correspondiente desviación estándar. Las dos últimas rondas mostraron claramente una mayor recuperación de aptámeros de DNA, destacando entre ellas la séptima ronda.

4.11.2. Aplicación del ELONA acoplado a qPCR al análisis de aptámeros individuales de las últimas rondas de selección y evolución de DNA

Una vez realizado el análisis de las rondas de los procesos DS y DE, se evaluaron de forma análoga las secuencias individuales (obtenidas por clonaje molecular) de las últimas rondas (DS08 y DE08). Para ello se siguió el esquema de trabajo mostrado en la Figura R27, obteniendo un total de 18 valores de Ct para cada aptámero individual analizado, interpolando a continuación los valores medios de Ct en la recta patrón de DNA (Figura R26) y calculando la cantidad total (en pmoles) de aptámeros unidos a Ebp1 en el ELONA. Los resultados se muestran en la Figura R30 para los aptámeros individuales de DS08.

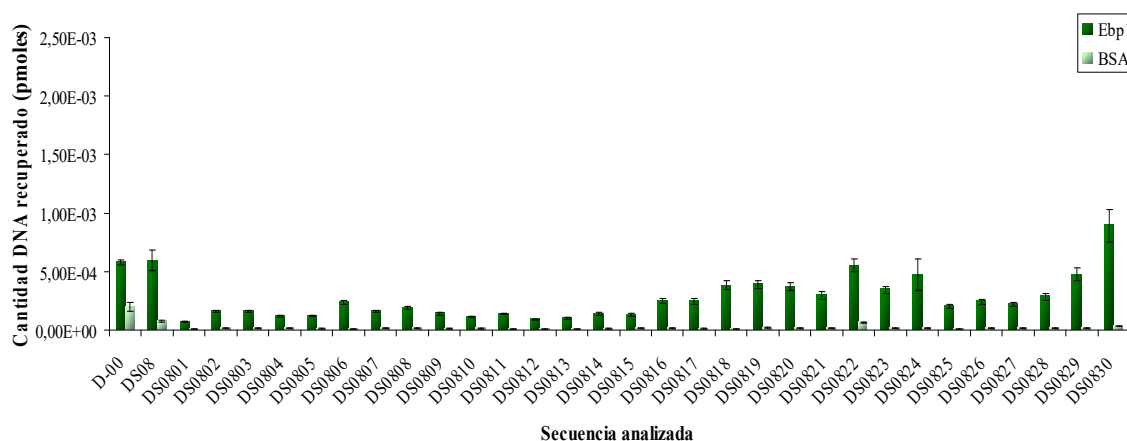


Figura R30. Cantidad de DNA recuperado en los ensayos de ELONA-qPCR frente a la proteína Ebp1 (en verde oscuro) o BSA (en verde claro) para la población inicial (D-00), la población de la última ronda de selección de DNA (DS08), y las secuencias individuales obtenidas por clonaje molecular de DS08 (DS0801-DS0830). La escala del eje *y* se ha escogido para que sea la misma que en la Figura R31 y se permita así un análisis comparativo de los dos procesos. Se muestra el valor promedio con su correspondiente desviación estándar.

Siguiendo el mismo esquema que para el proceso de DS, en la Figura R31 se muestran los resultados obtenidos para las secuencias individuales de la ronda DE08.

4. RESULTADOS

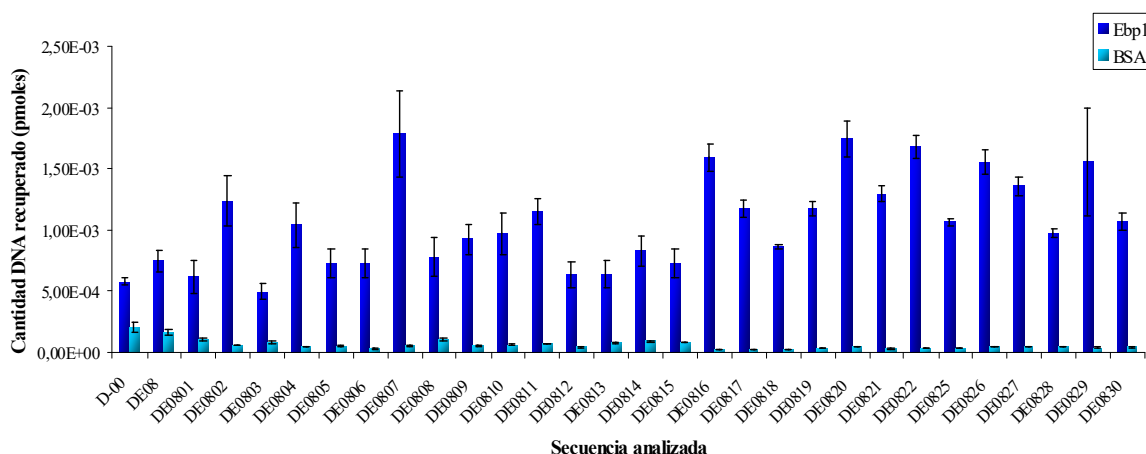


Figura R31. Cantidad de DNA recuperado en los ensayos de ELONA-qPCR frente a Ebp1 (en azul oscuro) o BSA (en azul claro) para la población inicial (D-00), la población de la última ronda de evolución de DNA (DE08), y las secuencias individuales obtenidas por clonaje molecular de DE08 (DE0801-DE0830). Se muestra el valor promedio con su correspondiente desviación estándar.

4.11.3. Análisis de las secuencias y estructuras secundarias de los aptámeros de DNA obtenidos al final de los procesos DS y DE

El análisis de los aptámeros individuales obtenidos por clonaje molecular de las rondas DS08 y DE08 mostró la mayor recuperación de DNA (es decir, la mayor capacidad de unión a Ebp1) en los numerados como 22 y 30 del proceso selectivo (DS0822, DS0830) y los 07, 16, 20 y 22 del proceso evolutivo (DE0807, DE0816, DE0820, DE0822). La cantidad de DNA recuperado para cada uno de estos seis aptámeros (Figuras R30 y R31) fue, respectivamente: $5,51 \times 10^{-4} \pm 5,45 \times 10^{-5}$ pmoles; $8,94 \times 10^{-4} \pm 1,39 \times 10^{-4}$ pmoles; $1,79 \times 10^{-3} \pm 3,59 \times 10^{-4}$ pmoles; $1,60 \times 10^{-3} \pm 1,11 \times 10^{-4}$ pmoles; $1,75 \times 10^{-3} \pm 1,44 \times 10^{-4}$ pmoles; $1,68 \times 10^{-3} \pm 9,45 \times 10^{-5}$ pmoles. Sus secuencias y estructuras secundarias en formato *dot-bracket* se muestran en la Tabla R11.

4. RESULTADOS

Tabla R11. Secuencia, estructura secundaria en formato *dot-bracket* (obtenida mediante mfold, con los parámetros correspondientes a DNA) y valor de energía libre (ΔG , en kcal/mol) asociada a esta estructura secundaria, para los seis aptámeros de las rondas DS08 y DE08 elegidos para el cálculo de su constante de afinidad frente a Ebp1 mediante ELONA acoplado a qPCR. Se muestra en negrita la región variable de la secuencia de los aptámeros. Se han subrayado ciertos motivos cortos de secuencia y estructura localizados total o parcialmente en la región variable (TCTA, TGTA, GTGA, TGTC y TGTT) que forman parte de lazos de 4 a 8 nt cerrados por tallos de 2 a 6 pb y que podrían constituir dominios de unión a Ebp1. Adicionalmente a los motivos de secuencia/estructura detectados, se estudió la posibilidad de aparición de motivos de tipo “*G-quadruplex*” empleando el *software* QGRS Mapper (<http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>). Ninguna de las secuencias de DNA seleccionadas (y tampoco de las demás producidas durante los procesos DS y DE) mostraron la presencia de estos motivos estructurales.

Aptámero	Secuencia (5'-3') y estructura secundaria	ΔG
DS0822	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCCATGTTTCTACCTGCACACGTACCCTTTCTACCGGGCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))	-2,38
DS0830	GCGGATCCAGACTGGTGTACCCATGCTGCCTGTGAGTTCAATTTTATTTATCCTAGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))	-1,49
DE0807	GCGGATCCAGACTGGTGTATTTGTTTCCTCAATCTAATTGTGCGACTGATCTTATGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))	-1,46
DE0816	GCGGATCCAGACTGGTGTGAATGCTGGGGATATACGTAGGGTGACCTCTATCCATTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))	-3,59
DE0820	GCGGATCCAGACTGGTGTATTTTCTCCGTAGTGTTCCTCGAGTAACGTCCGTTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))	-1,50
DE0822	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTATACTCACTGTTAGTGGCCGAGGGTTTTTTTGTTCAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))	-3,77

Además de las estructuras en formato *dot-bracket*, también se obtuvieron las estructuras secundarias en formato 2D utilizando el programa mfold. Dichas estructuras se muestran en la Figura R32. En los lazos de dichas estructuras se han marcado los motivos subrayados en las secuencias mostradas en la Tabla R11. Estos mismos motivos (TCTA, TGTA, GTGA, TGTC y TGTT) se han observado en diferentes aptámeros a lo largo de los procesos de DS y DE (para más detalles, ver Tabla A6 del Apéndice III).

4. RESULTADOS

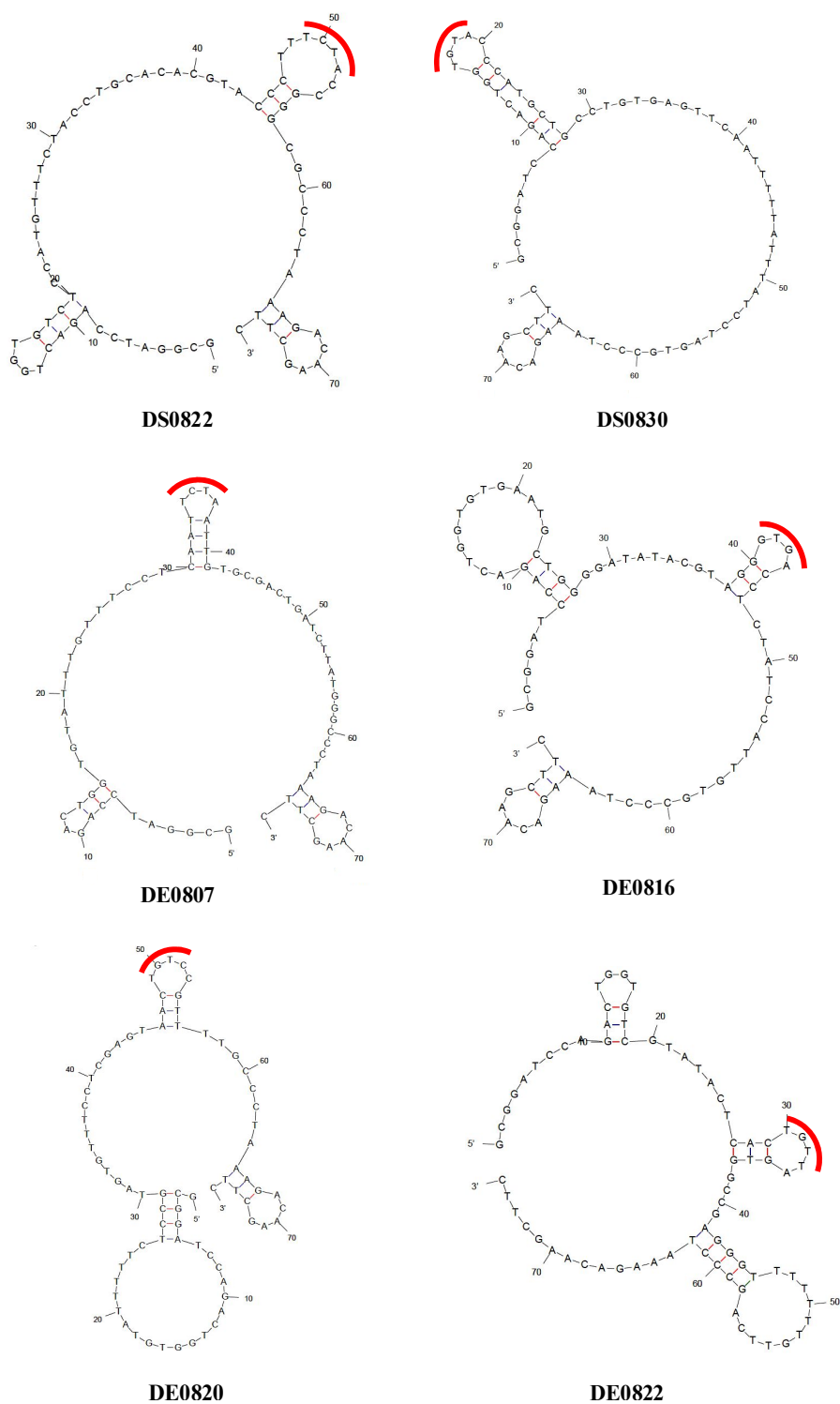


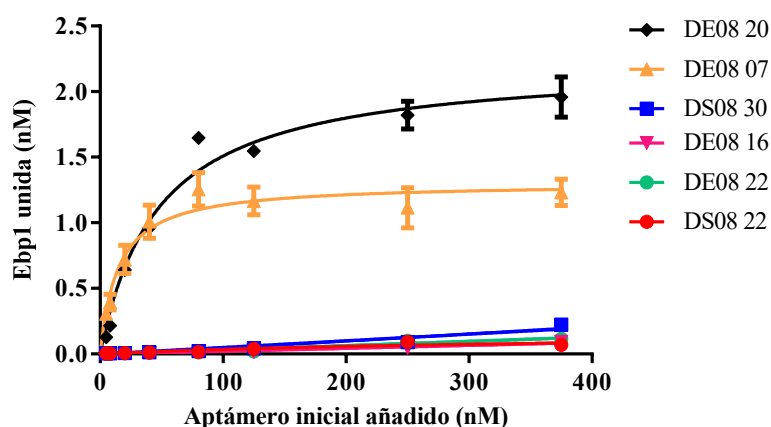
Figura R32. Predicción de la estructura secundaria por mfold, en formato plano o 2D, de los seis aptámeros escogidos de las rondas DS08 y DE08: DS0822, DS0830, DE0807, DE0816, DE0820 y DE0822. Los motivos de secuencia/estructura indicados en la Tabla R11 se marcan en rojo.

4.11.4. Aplicación del ELONA acoplado a qPCR al cálculo de la constante de afinidad de los aptámeros seleccionados de las poblaciones DS08 y DE08

Los seis aptámeros seleccionados de las poblaciones DS08 y DE08 se analizaron mediante ELONA-qPCR para calcular su constante de afinidad por Ebp1. Para ello, en el ensayo de ELONA se mantuvo fija la concentración de la proteína Ebp1 (42,7 nM) y se realizó una curva de concentraciones de aptámero: 5, 8, 20, 40, 80, 125, 250 y 375 nM. Se ensayó cada concentración por triplicado, y la qPCR posterior se realizó por duplicado, obteniendo un total de 6 valores de Ct. Mediante la interpolación de los valores de Ct en la recta patrón (mostrada en la Figura R26) y utilizando el programa GraphPad Prism, se obtuvieron las seis curvas de afinidad correspondientes a cada uno de los aptámeros (Tabla A1 del Apéndice IV y Figura R33). Para ello se utilizó el ajuste *One site - Specific binding* o de unión específica con un sitio de interacción, dado que era el que mejor parámetros de ajuste mostraba frente a los demás probados: *One site - Total binding* (unión total, un sitio de interacción), *One site - Fit total and nonspecific binding* (unión total e inespecífica), *Two sites - Specific binding Only* (unión específica, dos sitios de interacción), *Two sites - Fit total and nonspecific binding* (dos sitios de interacción, unión total y no específica).

Las curvas de afinidad se muestran en la Figura R33. Dos de ellas (correspondientes a los aptámeros DE0807 y DE0820) se ajustan al modelo de unión específica con un sitio de interacción, mientras que las demás solamente se ajustan a una recta.

4. RESULTADOS



Secuencia		DS0822	DS0830	DE0807	DE0816	DE0820	DE0822
B_{max} (nM Ebp1)	Media	N.A. [1]	N.A.	1,30	N.A.	2,23	N.A.
	Desv.Est.	N.A.	N.A.	0,06	N.A.	0,14	N.A.
K_d (nM apt.)	Media	N.A.	N.A.	14,82	N.A.	47,55	N.A.
	Desv. Est.	N.A.	N.A.	3,05	N.A.	9,68	N.A.
R^2		N.A.	N.A.	0,9540	N.A.	0,9753	N.A.
Especificidad (vs. BSA) [2]		8,68	28,39	34,01	63,54	43,59	51,10

Figura R33. Curvas de afinidad de los aptámeros DS0822, DS0830, DE0807, DE0816, DE0820 y DE0822 frente a Ebp1. Cada curva se obtuvo al analizar de forma individual la unión a Ebp1 del aptámero correspondiente mediante ELONA-qPCR, añadiendo diferentes concentraciones de aptámeros (5, 8, 20, 40, 80, 125, 250 y 375 nM) frente a una concentración fija de Ebp1 (42,7 nM) e interpolando los valores promedio de Ct ($n=6$ para cada aptámero) obtenidos en la qPCR en la recta patrón mostrada en la Figura R26. Estas curvas se obtuvieron mediante el ajuste *One site - Specific binding* de GraphPad Prism. La tabla inferior muestra los parámetros de afinidad y especificidad calculados para cada aptámero empleando dicho modelo. [1] N. A.: No analizable, por ajustarse únicamente a una recta en vez de a un modelo de unión específica con un sitio de interacción o a cualquiera de los demás modelos probados; [2] La especificidad se midió como la relación entre las señales obtenidas frente a Ebp1 y a BSA (80 nM de aptámeros frente a 42,7 nM de Ebp1 y 30 nM de BSA) (datos mostrados en las Figuras R30 y R31).

4.12. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS APTÁMEROS DE RNA POR EBP1 MEDIANTE *ENZYME-LINKED OLIGONUCLEOTIDE ASSAY* (ELONA) ACOPLADO A RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR). CARACTERIZACIÓN DE LOS APTÁMEROS DE RNA OBTENIDOS

La afinidad de los aptámeros de RNA por Ebp1 fue determinada mediante ELONA acoplado a RT-qPCR. Para ello, tras el ELONA se realizó una RT-qPCR en un solo paso, tal como se expuso en el apartado 3.2.21. Al igual que en el caso del DNA, la cuantificación de RNA se realizó mediante la interpolación de los valores de Ct obtenidos en los ensayos en una recta patrón elaborada previamente.

Para la construcción de la recta patrón se utilizaron, por triplicado, cantidades conocidas de RNA (comprendidas entre 18 y $1,8 \times 10^{-7}$ pmoles) que fueron amplificadas mediante RT-qPCR. Se utilizó el *software* BioRad iQ5 para calcular los valores correspondientes de Ct, mostrados en la Tabla R12.

Tabla R12. Resultados de la amplificación mediante RT-qPCR de cantidades conocidas de RNA molde para obtener la recta patrón.

RNA molde añadido (pmol)	log pmol	Ct (media, n=3)	Desviación estándar
18	1,26	N/A	N/A
1,8	0,26	2,55	0,27
$1,8 \times 10^{-1}$	-0,75	6,37	0,43
$1,8 \times 10^{-2}$	-1,75	11,02	0,90
$1,8 \times 10^{-3}$	-2,75	14,51	0,47
$1,8 \times 10^{-4}$	-3,75	17,89	0,18
$1,8 \times 10^{-5}$	-4,75	21,31	0,19
$1,8 \times 10^{-6}$	-5,75	24,13	0,38
$1,8 \times 10^{-7}$	-6,75	25,33	0,75
Control negativo	N/A	27,64	0,38

En las condiciones de RT-qPCR ensayadas se obtuvo un valor medio de Ct de $27,64 \pm 0,38$ para el control negativo (realizado por triplicado), lo que supone un límite de detección de RNA en el ensayo de $1,8 \times 10^{-7}$ pmoles. Los valores de Ct obtenidos se ajustaron a la recta patrón: $y = -3,3631x + 4,4740$, con $R^2 = 0,9816$, siendo y el valor de Ct y x el logaritmo de la cantidad de RNA molde de partida (Figura R34).

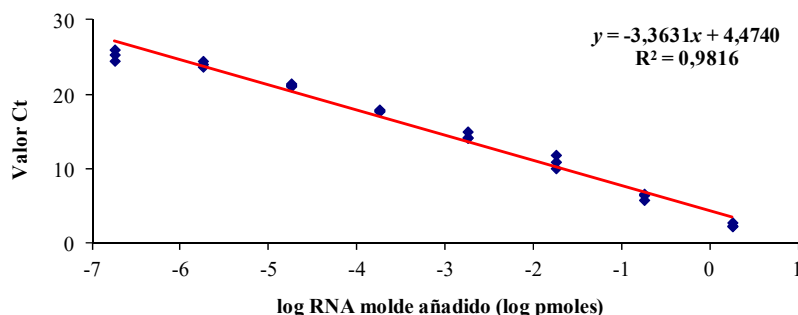


Figura R34. Recta patrón de la RT-qPCR realizada con cantidades decrecientes de RNA, comprendidas entre 18 y $1,8 \times 10^{-7}$ pmoles. La recta se obtuvo con el programa GraphPad Prism a partir de los valores de Ct calculados por el programa BioRad iQ5. Por interpolación en esta recta patrón se determinó posteriormente la cantidad de RNA recuperada en los ELONA-RT-qPCR realizados.

La recta patrón obtenida permitió, de forma análoga a lo expuesto en el apartado 4.11, la cuantificación de aptámeros de RNA (resultantes de los procesos RS y RE) unidos a Ebp1 en ensayos de ELONA acoplados a RT-qPCR, utilizándose en este caso $4,67 \mu\text{l}$ de los $90 \mu\text{l}$ recuperados del ELONA (frente a $5 \mu\text{l}$ en el caso de las qPCRs de DNA).

4.12.1. Aplicación del ELONA acoplado a RT-qPCR al análisis de las rondas de selección y evolución de RNA

El estudio de la afinidad de los aptámeros de RNA por la proteína Ebp1 se realizó de modo análogo a lo descrito para DNA en el apartado 4.11, con las diferencias señaladas en la sección de Métodos (requeridas por la insuficiente recuperación de aptámeros para ser detectados por la RT-qPCR siguiendo el método aplicado al DNA). El protocolo utilizado incluyó una primera etapa para el análisis de las 8 rondas de cada proceso siguiendo el esquema de trabajo mostrado en la Figura R27. De este modo se obtuvo un total de 18 valores de Ct a partir de las RT-qPCRs, cuyo promedio y desviación estándar fueron interpolados en la recta patrón (Figura R34) para calcular la cantidad de RNA recuperado en el ELONA (es decir, unido específicamente a Ebp1). Los resultados obtenidos en el proceso RS se muestran en la Figuras R35.

4. RESULTADOS

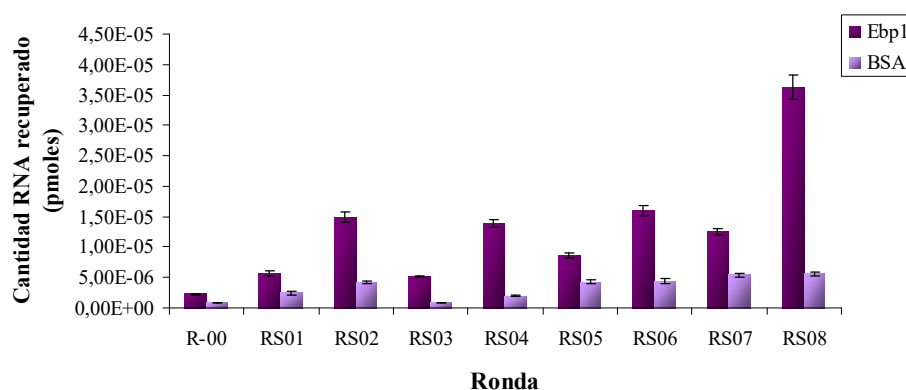


Figura R35. Cantidad de RNA recuperado en los ensayos de ELONA RT-qPCR frente a Ebp1 (en morado oscuro) o BSA (en morado claro) para la población inicial (R-00) y las 8 rondas de selección de RNA (RS01-RS08). La escala del eje y se ha escogido para que sea la misma que en la Figura R36 y se permita así un análisis comparativo de los dos procesos. Se muestra el valor promedio con su correspondiente desviación estándar. El cálculo se realizó en GraphPad Prism a partir de los valores de Ct determinados por el *software* BioRad iQ5, utilizando la recta patrón mostrada en la Figura R34. La recuperación de aptámeros de RNA es claramente superior en la octava ronda de selección, siendo por tanto mayor la afinidad de los aptámeros de esta población por la proteína Ebp1.

Análogamente, se realizó ELONA acoplado a RT-qPCR de las rondas del proceso de RE. Los resultados se muestran en la Figura R36.

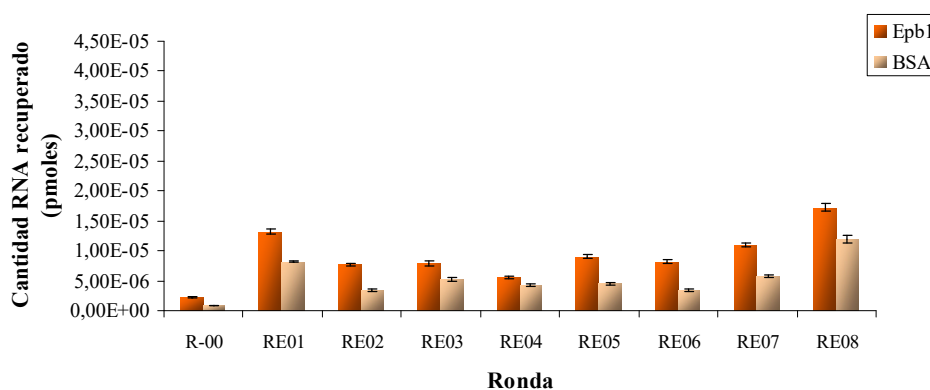


Figura R36. Cantidad de RNA recuperado en los ensayos de ELONA RT-qPCR frente a Ebp1 (en naranja oscuro) o BSA (en naranja claro) con la población inicial (R-00) y las 8 rondas de evolución de RNA (RE01-RE08). Se muestra el valor promedio con su correspondiente desviación estándar. Todas las rondas muestran una mayor recuperación de RNA (mayor afinidad) que la población inicial, destacando entre ellas la última ronda. La especificidad por Ebp1 frente a BSA resulta, para todas las rondas, menor que la obtenida en el proceso RS (Figura R35).

4.12.2. Aplicación del ELONA acoplado a RT-qPCR al análisis de aptámeros individuales de las últimas rondas de selección y evolución de RNA

Una vez realizado el análisis global de las rondas RS y RE, se llevaron a cabo ELONAs acoplados a RT-qPCR para evaluar las secuencias individuales (obtenidas mediante clonaje molecular) de las últimas rondas de selección y evolución de RNA: RS08 y RE08.

Al igual que en los casos anteriores, se realizó un triplicado de cada ELONA, un triplicado de cada aptámero individual en el ELONA y un duplicado de cada RT-qPCR (Figura R27). Se obtuvo un total de 18 medidas de Ct para cada aptámero, cuyo valor medio fue interpolado en la recta patrón mostrada en la Figura R34 (utilizando el programa GraphPad Prism). Con ello se obtuvo la cantidad total (en pmoles) de aptámeros unidos a Ebp1 en el ELONA. En estos ensayos con aptámeros individuales de RNA, el análisis de su afinidad por BSA solamente se realizó para los que presentaron una mayor afinidad por Ebp1: RS0823, RS0825, RS0826, RE0823, RE0828 y RE0829. Los resultados de la afinidad de los diferentes aptámeros individuales presentes en RS08 (y la especificidad en los casos indicados) se muestran en la Figura R37.

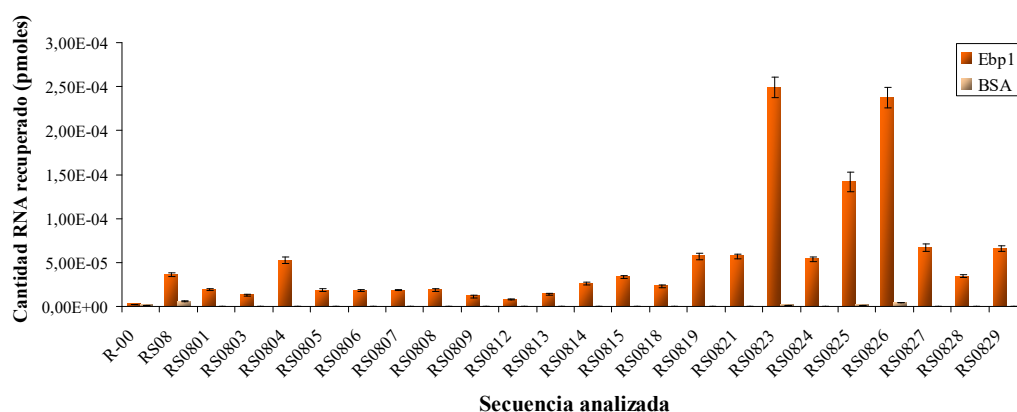


Figura R37. Cantidad de RNA recuperado en los ensayos de ELONA frente a la proteína Ebp1 (en naranja oscuro) o BSA (en naranja claro, aunque apenas es apreciable debido a la baja recuperación de RNA, para los aptámeros RS0823, RS0825 y RS0826) con la población inicial (R-00), la población de la última ronda de selección de RNA (RS08) y las secuencias individuales obtenidas por clonaje molecular de RS08 (RS0801-RS0829). La escala del eje y se ha escogido para que sea la misma que en la Figura R38 y se permita así un análisis comparativo de los dos procesos. Se muestra el valor promedio con su correspondiente desviación estándar.

Siguiendo el mismo procedimiento se analizaron las diferentes secuencias (obtenidas por clonaje molecular) de RE08 para comprobar su afinidad por la proteína Ebp1 y por BSA (Figura R38).

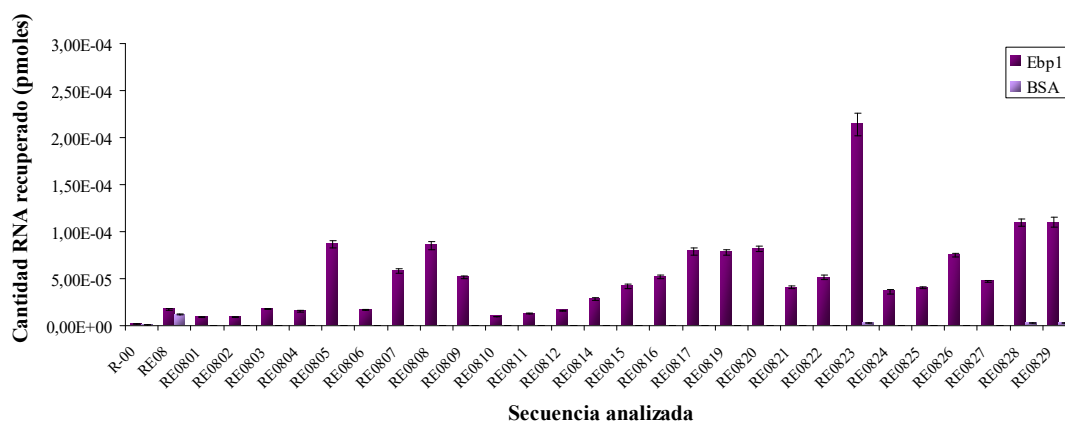


Figura R38. Cantidad de RNA recuperado en los ensayos de ELONA frente a Ebp1 (en morado oscuro) o BSA (en morado claro, apenas apreciable, para los aptámeros RE0823, RE0828 y RE0829) con la población inicial (R-00), la población de la última ronda de evolución de RNA (RE08) y las secuencias individuales obtenidas por clonaje molecular de RE08 (RE0801-RE0829). Se muestra el valor promedio con su correspondiente desviación estándar.

4.12.3. Análisis de las secuencias y estructuras secundarias de los aptámeros de RNA obtenidos al final de los procesos RS y RE

El estudio de la afinidad por Ebp1 de las secuencias individuales de las poblaciones RS08 y RE08 mostró que los aptámeros con mayor capacidad de unión a su diana fueron RS0823, RS0825, RS0826, RE0823, RE0828 y RE0829. La cantidad de RNA recuperado para cada uno de estos seis aptámeros (Figuras R37 y R38) fue, respectivamente: $2,49 \times 10^{-4} \pm 1,16 \times 10^{-5}$ pmoles; $1,42 \times 10^{-4} \pm 1,08 \times 10^{-5}$ pmoles; $2,37 \times 10^{-4} \pm 1,11 \times 10^{-5}$ pmoles; $2,14 \times 10^{-4} \pm 1,20 \times 10^{-5}$ pmoles; $1,09 \times 10^{-4} \pm 3,62 \times 10^{-6}$ pmoles; $1,10 \times 10^{-4} \pm 5,27 \times 10^{-6}$ pmoles. Sus secuencias y estructuras secundarias en formato *dot-bracket* se muestran en la Tabla R13.

4. RESULTADOS

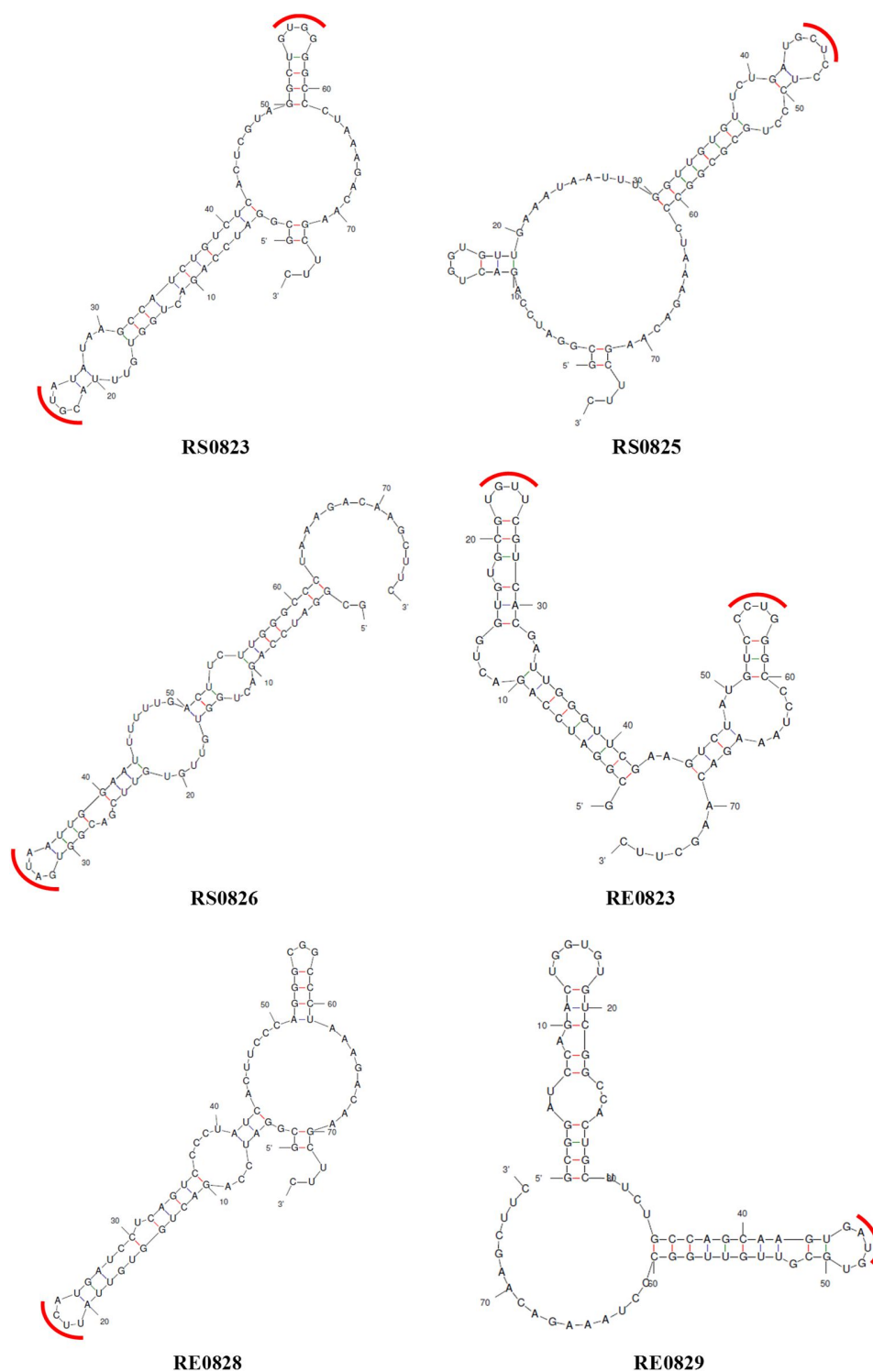
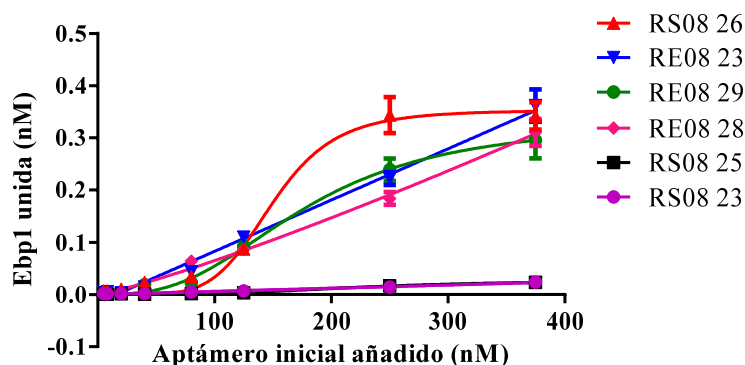


Figura R39. Predicción de la estructura secundaria en formato plano o 2D (utilizando el programa RNAfold) de los seis aptámeros escogidos de las poblaciones RS08 y RE08: RS0823, RS0825, RS0826, RE0823, RE0828 y RE0829. Los motivos de secuencia/estructura indicados en la Tabla R13 se marcan en rojo.

4.12.4. Aplicación del ELONA acoplado a RT-qPCR al cálculo de la constante de afinidad de los aptámeros seleccionados de las poblaciones RS08 y RE08

Los seis aptámeros seleccionados de RS08 y RE08 se analizaron mediante ELONA-RT-qPCR para calcular su constante de afinidad por Ebp1. Para ello, en el ensayo de ELONA se mantuvo fija la concentración de Ebp1 (42,7 nM) y se realizó una curva de concentraciones de aptámero: 5, 8, 20, 40, 80, 125, 250 y 375 nM. Se ensayó cada concentración por triplicado, y la RT-qPCR posterior se llevó a cabo por duplicado, obteniendo un total de 6 valores de Ct. Mediante la interpolación de los valores de Ct con la recta patrón correspondiente (Figura R34) y utilizando el programa GraphPad Prism, se obtuvieron las curvas de afinidad correspondientes a cada uno de los aptámeros (Tabla A2 del Apéndice IV y Figura R40). Para ello se utilizó el ajuste *One site - Specific binding* (unión específica con un sitio de interacción), dado que era el que mejor parámetros de ajuste mostraba frente a los demás probados: *One site - Total binding* (unión total), *One site - Fit total and nonspecific binding* (unión total e inespecífica), *Two sites - Specific binding Only* (unión específica, dos sitios de interacción), *Two sites - Fit total and nonspecific binding* (unión total y no específica). Tres de las curvas (correspondientes a los aptámeros RS0825, RS0826 y RE0829) se ajustan al modelo de unión específica con un sitio de interacción, mientras que las demás solamente se ajustan a una recta.

4. RESULTADOS



Secuencia		RS0823	RS0825	RS0826	RE0823	RE0828	RE0829
B_{max} (nM Ebp1)	Promedio	N.A. [1]	0,03	0,35	N.A.	N.A.	0,33
	Desv.Est.	N.A.	0,00	0,02	N.A.	N.A.	0,02
K_d (nM apt.)	Promedio	N.A.	222,20	150,20	N.A.	N.A.	177,60
	Desv. Est.	N.A.	20,84	12,60	N.A.	N.A.	13,48
R^2		N.A.	0,9924	0,9901	N.A.	N.A.	0,9966
Especificidad (vs. BSA) [2]		270,78	243,13	53,84	72,81	36,76	36,81

Figura R40. Curvas de afinidad de los aptámeros RS0823, RS0825, RS0826, RE0823, RE0828 y RE0829 frente a Ebp1. Cada curva se obtuvo al analizar de forma individual la unión a Ebp1 del aptámero correspondiente mediante ELONA-RT-qPCR, añadiendo diferentes concentraciones de aptámeros (5, 8, 20, 40, 80, 125, 250 y 375 nM) frente a una concentración fija de Ebp1 (42,7 nM) e interpolando los valores promedio de Ct (n=6 para cada aptámero) obtenidos en la RT-qPCR en la recta patrón mostrada en la Figura R34. Estas curvas se obtuvieron mediante el ajuste *One site - Specific binding* de GraphPad Prism. La tabla inferior muestra los parámetros de afinidad y especificidad calculados para cada aptámero empleando dicho modelo. [1] N. A.: No analizable, por ajustarse únicamente a una recta en vez de a un modelo de unión específica con un sitio de interacción o a cualquiera de los demás modelos probados; [2] La especificidad se midió como la relación entre las señales obtenidas frente a Ebp1 y a BSA (80 nM de aptámeros frente a 42,7 nM de Ebp1 y 30 nM de BSA) (datos mostrados en las Figuras R37 y R38).

4.13. VISUALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL IRES DE FMDV, LA PROTEÍNA EBP1 Y DE COMPLEJOS IRES-EBP1 MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

Uno de los objetivos del trabajo a largo plazo iniciado en esta Tesis fue el estudio mediante AFM de la estructura del IRES de FMDV, de la proteína Ebp1, así como la interacción entre ambas moléculas y, eventualmente, con los aptámeros anti-Ebp1 obtenidos a lo largo del presente trabajo.

4.13.1. Caracterización estructural del IRES de FMDV mediante AFM

Para el análisis estructural del elemento IRES de FMDV en condiciones nativas mediante AFM, el transcrito del RNA viral que contiene el IRES se incubó en TS a una concentración de 1,31 nM, a temperatura ambiente y en cámara húmeda (proceso descrito en el apartado 3.2.22 de Materiales y Métodos). Una vez preparada la muestra, ésta se analizó mediante AFM en modo *tapping* en aire a temperatura ambiente (Figura R41).

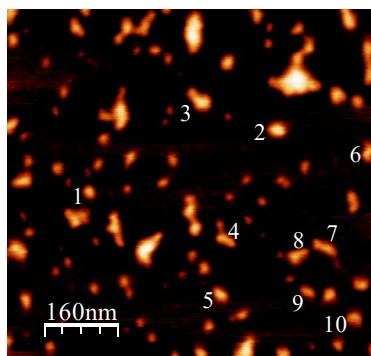


Figura R41. Imagen de AFM de una muestra de IRES de FMDV en condiciones nativas, a una concentración final de 1,31 nM de la molécula en TS. A partir de las estructuras individuales identificadas en esta muestra se hizo un análisis cuantitativo de la longitud, altura media, área y volumen de las 10 moléculas numeradas en la figura.

Las imágenes de AFM fueron analizadas mediante los programas WSxM e Image-J, gracias a los cuales se estudiaron 10 moléculas individuales del IRES de FMDV (señaladas en la Figura R41). Como ejemplo, las moléculas números 3, 4 y 6 se muestran en la Figura R42.

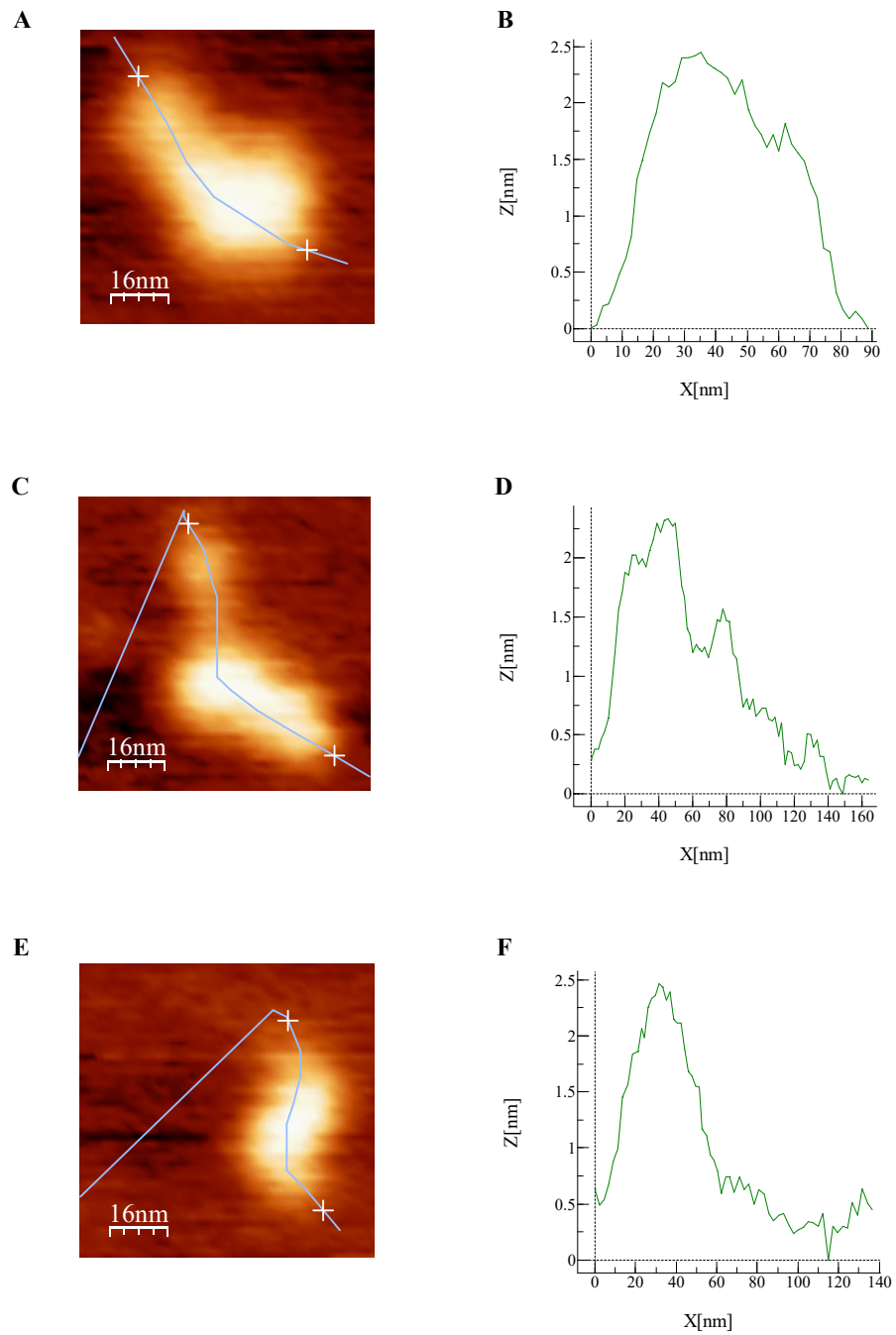


Figura R42. Moléculas individuales de IRES de FMDV números 3 (A, B), 4 (C, D) y 6 (E, F) marcadas en la Figura R41. Se muestra la imagen de las moléculas a alta resolución (A, C, E) y el análisis de la longitud y altura correspondiente a sus perfiles longitudinales (B, D, F).

4. RESULTADOS

Siguiendo el patrón de análisis ejemplificado en la Figura R42, se completó el estudio del perfil de las 10 moléculas indicadas en la Figura R41, que por lo general mostraban morfologías extendidas o angulares. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla R14.

Tabla R14. Análisis de los perfiles de 10 moléculas de IRES de FMDV identificadas en una muestra incubada en TS a temperatura ambiente y visualizada por AFM (Figura R41). Las medidas se obtuvieron utilizando los programas WSxM e Image-J.

Molécula	Longitud (nm)	Altura media (nm)	Área (nm ²)	Volumen (nm ³)
1	35,43	2,10	490,14	264,31
2	44,28	2,11	831,11	598,15
3	65,26	2,32	1704,83	1275,44
4	79,01	1,67	867,64	457,24
5	44,06	2,02	599,74	339,61
6	54,54	1,82	672,80	380,24
7	64,12	1,63	831,11	362,37
8	55,99	1,93	843,28	420,37
9	41,20	1,42	389,68	127,85
10	50,21	1,25	340,97	138,12
Media y SD	53,0 ± 13,2	1,8 ± 0,3	757,1 ± 385,9	436,4 ± 327,1

4.13.2. Caracterización estructural de la proteína Ebp1 mediante AFM

Tras la visualización del IRES de FMDV plegado en TS, se analizó por AFM la proteína Ebp1 en este mismo tampón y a la misma temperatura, ya que son las condiciones en las que se llevaron a cabo los procesos de DS, DE, RS y RE. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la Figura R43.

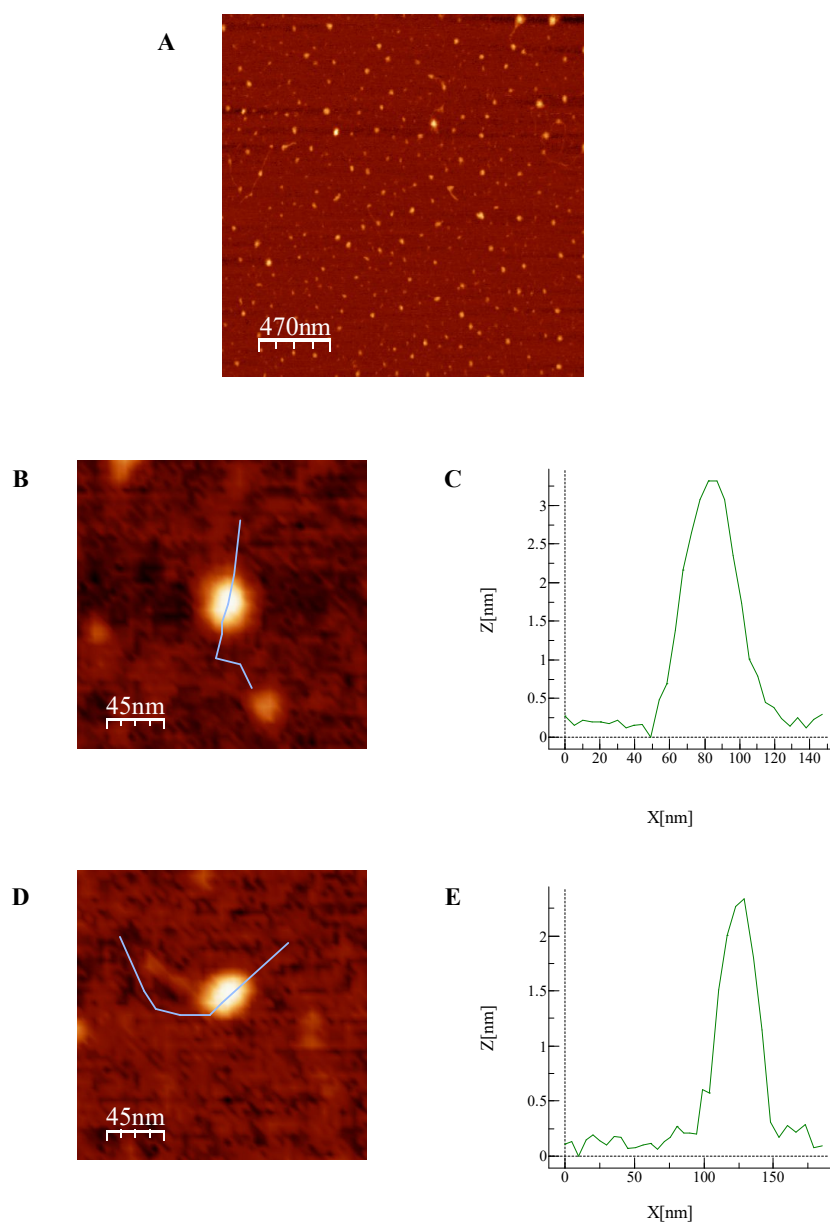


Figura R43. Imágenes de AFM de una preparación de la proteína Ebp1 incubada en TS en las mismas condiciones que en los procesos de DS, DE, RS y RE. A) Imagen de una muestra de Ebp1 incubada a una concentración final de 1,31 nM. B, D) Imágenes a mayor resolución de dos moléculas individuales de Ebp1. C, E) Análisis de sus correspondientes perfiles longitudinales.

Como se observa en la Figura R43, el plegamiento de la proteína Ebp1 en las condiciones de selección/evolución de aptámeros es claramente más homogéneo que el del IRES de FMDV, mostrando en casi todas las moléculas visualizadas una morfología globular y redondeada, de 40 ± 5 nm de diámetro.

4.13.3. Caracterización de la interacción entre el IRES de FMDV y la proteína Ebp1 mediante AFM

Una vez analizadas las imágenes de AFM del IRES de FMDV y de la proteína Ebp1 por separado, se procedió a visualizar preparaciones obtenidas al incubar mezclas de ambas moléculas en TS. En este caso se realizaron dos tipos de análisis: en el primero se utilizaron $3,94 \times 10^{-2}$ pmoles de cada una de las moléculas, dejándolas interaccionar durante 1 h a 37°C antes de su deposición sobre la superficie, mientras que el segundo se realizó con $1,97 \times 10^{-2}$ pmoles de ambas moléculas pero con un tiempo de interacción de 2 h (Figura R44).

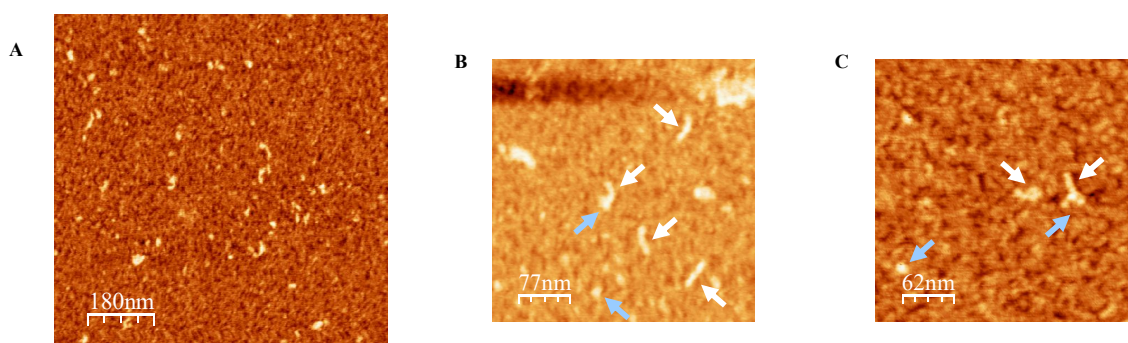


Figura R44. Imágenes de AFM para estudiar la posible interacción entre el IRES de FMDV y la proteína Ebp1. A, B) Imágenes de muestras de IRES de FMDV incubado con la proteína Ebp1 en TS durante 1 hora a 37°C y con una concentración final de 1,31 nM de cada molécula. C) Imagen de una muestra de IRES de FMDV incubado con la proteína Ebp1 en TS durante 2 horas a 37°C y con una concentración final de 0,66 nM de cada molécula. En los paneles B y C, la flecha blanca señala lo que podría ser el IRES de FMDV aislado, o bien interaccionando con la proteína Ebp1 (señalada en azul).

En las imágenes analizadas se aprecia una menor concentración de especies moleculares reconocibles con respecto a los ensayos independientes con el IRES de FMDV y de Ebp1, a pesar de haber utilizado la misma cantidad total de moléculas. En cualquier caso, se realizó la toma de imágenes a mayor resolución para comprobar la presencia de estructuras que pudiesen indicar la interacción entre ambos tipos de moléculas. Además de los posibles complejos IRES-Ebp1 mostrados en la Figura R44, otro ejemplo de las morfologías obtenidas se muestra en la Figura R45. En ella se aprecia una estructura global similar a la letra μ , en la que la parte señalada en azul podría corresponder a la proteína Ebp1 interaccionando con el IRES de FMDV (señalado con una flecha blanca). No obstante, resulta evidente que a lo largo de este trabajo solamente se ha podido iniciar la caracterización por AFM de la posible interacción IRES-Ebp1, investigación que será objeto de proyectos futuros en el laboratorio. También se continuará esta línea aquí iniciada con el estudio del

posible bloqueo de la interacción IRES-Ebp1 mediado por la unión a Ebp1 de los aptámeros específicos (de DNA o de RNA) obtenidos en este trabajo.

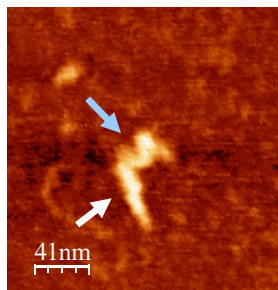


Figura R45. Imagen de AFM de uno de los posibles complejos de interacción observados en el experimento realizado incubando en TS el IRES de FMDV y Ebp1 (ambas moléculas a concentración 0,66 nM) durante 2 h a 37°C. La flecha blanca señala lo que podría ser el IRES de FMDV interaccionando con la proteína Ebp1, en azul.

5. DISCUSIÓN

Entre los numerosos aptámeros que se han desarrollado frente a distintas dianas desde la puesta a punto del método SELEX en 1990, muchos de ellos poseen un gran potencial para su aplicación en el campo de la virología, no solamente en investigación básica, sino también para su utilización como herramientas biotecnológicas útiles en diagnóstico y terapia (Wandtke et al. 2015). Así pues, en la bibliografía encontramos una amplia variedad de aptámeros con afinidad por elementos estructurales y funcionales esenciales de diferentes virus, entre los que se pueden mencionar la polimerasa 3D de FMDV (Ellingham et al. 2006), la oncoproteína E6 del papilomavirus humano (Belyaeva et al. 2014), glicoproteínas del citomegalovirus humano (Wang et al. 2000), la glicoproteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (Khali et al. 2003), diferentes proteínas del virus de la hepatitis C (Fukuda et al. 1997, Bellocave et al. 2003, Chen et al. 2009), la hemaglutinina del virus influenza A (Shiratori et al. 2014), la nucleocápside del virus de la fiebre del Valle del Rift (Ellenbecker et al. 2012), o el dominio P de la cápside de norovirus humanos (Moore et al. 2015). También se han desarrollado aptámeros frente a diferentes regiones estructurales/funcionales del genoma de algunos ribovirus y retrovirus, destacando los obtenidos frente al elemento IRES del RNA genómico del virus de la hepatitis C (Kikuchi et al. 2002, Kikuchi et al. 2003, Romero-Lopez et al. 2009) o los específicos de elementos presentes en el extremo 5'-UTR del virus de la inmunodeficiencia humana (Watrin et al. 2009, Sanchez-Luque et al. 2014). En el presente trabajo, en lugar de obtener aptámeros frente al IRES de FMDV o frente a alguna de las proteínas de este virus, se decidió elegir una diana esencial para la replicación viral pero que no forma parte de FMDV: la proteína Ebp1 del hospedador, que interacciona con el elemento IRES de FMDV y contra la cual aún no se han obtenido aptámeros. Ello requirió optimizar una serie de procedimientos experimentales, tal como se ha expuesto en la sección de Resultados.

A lo largo de este trabajo se han realizado 8 rondas de selección y de evolución *in vitro* de aptámeros de DNA y de RNA con afinidad por la proteína Ebp1. Para ello se utilizó en cada ronda una relación $\approx 20:1$ de ácidos nucleicos:Ebp1, realizándose la partición con resina Ni-NTA agarosa y la amplificación mediante PCR seguida de producción de banda sencilla para aptámeros de DNA, o bien mediante RT/PCR/IVT para aptámeros de RNA. Con ambos tipos de aptámeros se realizaron PCRs mutagénicas en el caso de los procesos de evolución *in vitro*, mediante la adición de 0,5 mM de $MnCl_2$ a la mezcla de reacción. Se analizó, empleando diferentes métodos, la afinidad por Ebp1 de las poblaciones obtenidas. Entre ellos destacó la técnica de ELONA acoplado a qPCR o RT-qPCR, debido a su mayor reproducibilidad, rapidez y sensibilidad. Utilizando esta metodología fue posible caracterizar la constante de disociación (K_d) y la máxima capacidad de unión a ligando (B_{max}) tanto para poblaciones como para aptámeros individuales de DNA y RNA. Las poblaciones

resultantes de las 8 rondas realizadas en cada uno de los cuatro procesos fueron clonadas molecularmente y secuenciadas (al menos 30 clones por ronda). Se analizaron las secuencias obtenidas y sus correspondientes estructuras secundarias, identificándose en cada proceso una serie de motivos cortos de secuencia y estructura, presentes en aptámeros de alta afinidad por Ebp1, que podrían estar implicados en la interacción de los aptámeros con la proteína. Por último se analizó mediante AFM la conformación tridimensional del IRES de FMDV, de la proteína Ebp1 y de mezclas de ambas moléculas.

5.1. DETERMINACIÓN DEL MÉTODO PARA INCREMENTAR LA TASA DE MUTACIÓN EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La DNA polimerasa utilizada para las amplificaciones por PCR a lo largo de este trabajo ha sido la EHF (*Expand High Fidelity*) de Roche. La elección de esta enzima se debió a su baja tasa de error: $\sim 4,33 \times 10^{-6}$ mutaciones introducidas por nucleótido copiado, según los datos del fabricante. Dado que una DNA polimerasa se define como de alta fidelidad cuando su tasa de error es $\leq 5 \times 10^{-6}$ (Cline et al. 1996), la EHF se consideró muy apropiada para la amplificación de poblaciones de aptámeros en los procesos de selección *in vitro* (DS y RS). Sin embargo, para la obtención de los aptámeros de DNA y RNA mediante el proceso de evolución *in vitro* (DE y RE) fue necesario establecer un método que permitiese la introducción de un elevado número de mutaciones al azar en las secuencias. De esta manera, aumentaría la variabilidad de las poblaciones de aptámeros durante su amplificación tras cada etapa de selección (Joyce 2007).

El aumento de la variabilidad de secuencias en poblaciones de aptámeros suele realizarse mediante PCR durante la etapa de amplificación (Lin-Goerke et al. 1997, Yu et al. 2009, Zhong et al. 2011). Esto ofrece la ventaja de que la amplificación mutagénica puede aplicarse tanto para los procesos de evolución *in vitro* de DNA como para los de RNA (en este segundo caso, previa retrotranscripción), introduciendo una misma tasa de mutación en ambos casos. Con este planteamiento y teniendo en cuenta la bibliografía consultada, que en la mayoría de casos se refiere a procesos realizados empleando la enzima *Taq* DNA polimerasa (Leung et al. 1989, Eckert and Kunkel 1990, 1991, Bebenek et al. 1992, Cadwell and Joyce 1992, 1994, Innis et al. 1995, Pavlov et al. 2004), se realizaron ensayos de PCRs mutagénicas a partir de una PCR de alta fidelidad con EHF. Para ello se probaron tres modificaciones alternativas en la mezcla de reacción: 1) desbalance en la concentración de nucleótidos A y T respecto a G y C; 2) incremento de la concentración final del catión Mg^{2+} (suplementado como $MgCl_2$); y 3) adición de Mn^{2+} (en forma de $MnCl_2$) a diferentes concentraciones finales.

Además, para comprobar el efecto mutagénico de las condiciones experimentales probadas se emplearon tres DNAs molde diferentes para la PCR:

1) Población M1-40: población heterogénea de oligonucleótidos de 76 nt de longitud diseñada para los posteriores procesos de selección y evolución *in vitro* de DNA y RNA (Figura I3). En ella, cada secuencia estaba formada por 40 nt centrales variables flanqueados a ambos lados por 18 nt constantes. Mediante este tipo de ampliificaciones se podía comprobar la eficiencia de cada reacción de PCR mutagénica, medida por la intensidad de la banda producida, con lo que se estimaba su utilidad para los procesos DE y RE que se iban a realizar durante el trabajo. Sin embargo, al tratarse de una población de partida heterogénea, ésta no era apropiada para calcular la tasa de mutación introducida con las diferentes variantes del proceso mutagénico.

2) Molécula R5-26: molécula individual de la misma longitud que M1-40 (76 nt), si bien en este caso toda la secuencia (regiones constantes y variable) es conocida. Por tanto, R5-26 se utilizó para calcular la tasa de mutación obtenida en las diferentes condiciones ensayadas empleando una molécula con las mismas características que las utilizadas en los procesos de evolución de aptámeros.

3) Molécula NS2: molécula de mayor longitud que las anteriores (599 nt) y secuencia constante, correspondiente a la región del genoma del VHC que codifica la proteína NS2. Su utilización permitió un cálculo más preciso de la tasa de mutación de EHF en las condiciones de PCRs mutagénicas ensayadas.

En las ampliificaciones por PCR utilizadas como control, en ausencia de condiciones mutagénicas, la menor tasa de error que se pudo obtener en este trabajo fue de aproximadamente $<1,79 \times 10^{-3}$ errores/nt copiado (menor de 1 mutación introducida en cada molécula de 559 nt), aunque en función de la información proporcionada por el fabricante de la DNA polimerasa EHF su tasa de error sería realmente tres órdenes de magnitud menor. Los datos mostrados en el apartado 4.2 de Resultados indicaron que las secuencias amplificadas de mayor longitud poseen menor tolerancia a la mutagénesis que las de menor longitud, como era esperable (Eigen 1971, Domingo and Holland 1997). Por otra parte, ni el desbalance de nucleótidos en la mezcla de reacción de PCR ni el aumento de la concentración de $MgCl_2$ en ella tuvieron efecto mutagénico significativo sobre las secuencias ensayadas en nuestras condiciones experimentales. En cuanto a la capacidad de la enzima EHF para amplificar DNA en condiciones alejadas de las óptimas establecidas por el fabricante, los resultados de este trabajo mostraron que ésta es funcional incluso en concentraciones iónicas y concentraciones relativas de nucleótidos muy diferentes de las estándar (Figuras R3-R6).

Por su parte, el catión manganeso sí mostró un claro efecto mutagénico en las condiciones de PCR ensayadas. La mayor tasa de mutación introducida en el DNA molde R5-26 se obtuvo al utilizar una concentración final de 1 mM de MnCl_2 , lo que produjo $2,75 \times 10^{-1}$ errores por nucleótido copiado. Sin embargo, la eficiencia de la amplificación obtenida con la población M1-40 en estas condiciones era considerablemente menor que la del control positivo (sin MnCl_2 , ver Figura R6), por lo que la adición de 1 mM de MnCl_2 a la mezcla de reacción no resultaba adecuada para llevar a cabo los procesos evolutivos de DNA y RNA (DE y RE). Por el contrario, la adición de una concentración final de 0,5 mM de MnCl_2 a la reacción de PCR sí produjo un buen rendimiento de la amplificación en la población M1-40 (Figura R6), y la tasa de mutación introducida en estas condiciones seguía siendo suficientemente elevada: $2,25 \times 10^{-2}$ errores/nt para el molde R5-26 y $1,13 \times 10^{-1}$ errores/nt para NS2. Tales datos llevaron al establecimiento de este tipo de PCR mutagénica (suplemento de 0,5 mM de MnCl_2 en la mezcla de reacción) como método para la generación de variabilidad en los procesos de DE y RE a lo largo del presente trabajo. Al no utilizarse desbalances de nucleótidos en las amplificaciones mutagénicas realizadas, durante los procesos DE y RE no se introdujeron sesgos composicionales ni se forzó una tendencia hacia determinadas transiciones o transversiones, por lo que sería esperable una exploración exhaustiva del espacio de secuencias accesible en cada caso.

5.2. OBTENCIÓN DE APTÁMEROS DE DNA Y DE RNA ESPECÍFICOS DE EBP1 MEDIANTE SELECCIÓN Y EVOLUCIÓN *IN VITRO*

Desde la puesta a punto de la tecnología SELEX en 1990, la obtención de aptámeros mediante sistemas de selección y evolución *in vitro* ha suscitado un creciente interés para distintos tipos de aplicaciones. Así, en la actualidad son ya más de 8000 los artículos publicados sobre este tema en las bases de datos PubMed e ISI Web of Knowledge. Entre los aptámeros de DNA y RNA generados hasta la fecha, son numerosos los que poseen afinidad por proteínas, cuyos mejores valores de K_d se sitúan en el rango de pM-nM (Xi et al. 2014, Bruno 2015, Sun and Zu 2015). También existen numerosas publicaciones que describen aptámeros útiles en el campo de la virología. Sin embargo, entre ellos únicamente un grupo se ha desarrollado contra una proteína de FMDV, concretamente, contra la enzima 3D (RNA polimerasa-RNA dependiente viral) (Ellingham et al. 2006, Bentham et al. 2012, Forrest et al. 2014). Por todo ello, en este trabajo se consideró oportuno obtener aptámeros de DNA y de RNA específicos contra la proteína Ebp1, ya que ofrecía el aliciente de ser una molécula necesaria para la replicación de FMDV (al interactuar con el

elemento IRES del genoma viral) a pesar de no formar parte de éste, sino del proteoma del hospedador (Pilipenko et al. 2000, Pacheco et al. 2008).

Las metodologías desarrolladas para la obtención de aptámeros, como se vio en el apartado 1.4 de la Introducción, son muy variables en función tanto de la diana como de las condiciones en las que se produce la unión aptámero-diana, por lo que un pequeño cambio metodológico puede tener un gran impacto en los resultados obtenidos (Murphy et al. 2003). Un ejemplo de ello es el sistema de partición que puede utilizarse para separar las moléculas unidas a la diana de aquéllas que no lo están. Igualmente, el número de rondas de selección-amplificación que suele realizarse para obtener aptámeros varía entre 6 y 15, analizándose habitualmente entre 20 y 50 aptámeros individuales de la última ronda para cuantificar su afinidad y especificidad por la diana (Stoltenburg et al. 2007).

Partiendo de este hecho, y teniendo en cuenta la bibliografía manejada, se estableció que la proteína diana Ebp1, fusionada a una cola de 6 histidinas en su extremo N-terminal, sería unida a una resina Ni-NTA agarosa para llevar a cabo la inmovilización del ligando al soporte inerte en el SELEX (Barfod et al. 2009, Pan and Clawson 2010). Del mismo modo, se determinó *a priori* que el total de rondas que se efectuarían en cada uno de los cuatro procesos (DS, DE, RS y RE) sería de 8 (salvo que al llegar a la octava ronda no se observara un incremento claro de afinidad de la población por la diana) y que en las poblaciones resultantes de cada una de las rondas se secuenciarían al menos 30 clones moleculares. Así, además de las secuencias clonales obtenidas de la población combinatorial de partida, en cada uno de los cuatro procesos se manejaría un mínimo de 240 clones moleculares. Esto permitiría no solamente la obtención de distintos aptámeros con afinidad por Ebp1, sino también la realización de un estudio comparativo de los cuatro procesos. Para ello resultaba esencial la realización de los procesos DS, DE, RS y RE de modo análogo, lo que se consiguió combinando tres estrategias:

1) Manteniendo la misma proporción aptámero:Ebp1 ($\approx 20:1$) en los cuatro procesos. En el caso del DNA, el ratio fue de 408 pmoles de aptámero frente a 20,5 pmoles de Ebp1, y en el de RNA fue de 816 pmoles de aptámero frente a 41 pmoles de proteína. Las diferentes cantidades de material utilizadas en los procesos de DNA y RNA se debieron a la diferencia de rendimiento de la digestión de dsDNA con exonucleasa λ frente a la transcripción *in vitro* de RNA. El ratio aptámero:ligando elegido estuvo en consonancia con otros artículos publicados (Duclair et al. 2015), si bien en nuestro caso se mantuvo constante durante las 8 rondas de cada proceso.

2) Utilizando las mismas condiciones de amplificación en las fases comunes de los diferentes procesos. Así, en los protocolos RS y RE, tras recuperar el RNA seleccionado en la

incubación con Ebp1, éste se amplificó en dos pasos independientes (RT y PCR), realizando la PCR en las mismas condiciones experimentales utilizadas para la amplificación del ssDNA seleccionado en los procesos DS y DE.

3) Manteniendo inalteradas las demás variables del protocolo en los cuatro procesos: sistema de inmovilización de la proteína diana, selección negativa contra la resina Ni-NTA agarosa, tiempo y condiciones de incubación (temperatura, agitación y tampón) con la diana, protocolos de lavado y elución y, como ya se ha comentado, las condiciones y programa de amplificación utilizados.

Gracias a ello, los aptámeros obtenidos mediante los procesos DS, RS, DE y RE pudieron estudiarse comparativamente con objeto de analizarlos tanto de forma individual como en conjunto: comparación entre los aptámeros obtenidos frente a Ebp1 mediante selección/evolución *in vitro* (apartado 5.6) y comparación entre los aptámeros de DNA/RNA (apartado 5.7).

5.3. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD APTÁMEROS-PROTEÍNA MEDIANTE SELBA Y SELBA DE AFINIDAD

La técnica de SELBA se puso a punto en este trabajo como una primera opción para estudiar la afinidad por Ebp1 de las poblaciones de aptámeros generados en cada ronda. Se trata de una metodología no descrita previamente en la bibliografía y que combina dos aspectos interesantes: el protocolo que se utiliza es similar al usado en los propios procesos de selección, y además no requiere el marcaje de los aptámeros para ser analizados. Sin embargo, sus resultados no fueron satisfactorios, dado que se obtuvo una afinidad diferente para cada ronda cuando se empleaban alícuotas diferentes de ella, tanto en DNA como en RNA (apartados 4.7 y 4.8). Esto indicaba que la técnica era demasiado dependiente del efecto de muestreo a partir de poblaciones heterogéneas en secuencia y estructura. Tal limitación se superaría ensayando aptámeros individuales en vez de poblaciones heterogéneas, pero se prefirió explorar técnicas alternativas que sirviesen tanto para poblaciones como para muestras homogéneas, de forma que con ellas se obtuvieran resultados comparables en uno y otro caso.

Por su parte, al efectuar los SELBAs de afinidad (apartado 4.9) se observó que el resultado obtenido en la incubación negativa (únicamente con resina Ni-NTA agarosa, sin Ebp1) era en ocasiones igual o mayor que el correspondiente a la resina unida a Ebp1. Esto puede ser debido a una baja especificidad de unión de los aptámeros en el ensayo que implique su interacción con los diferentes elementos que intervienen en el proceso de selección (y no solamente la diana). Otra

posibilidad para explicar tales resultados estaría relacionada con un incremento de afinidad por la resina a la que está unida la proteína diana de este trabajo, a pesar de haberse realizado las correspondientes contraselecciones frente a resina sin proteína (tal como se describe en Materiales y Métodos). De hecho, un caso similar fue descrito por el grupo de Nastasijevic tras la identificación, durante el transcurso de sus trabajos, de moléculas de DNA capaces de unirse a partículas magnéticas de Ni-NTA en ausencia de diana (Nastasijevic et al. 2008). Como resultado, mostraron que la afinidad de los aptámeros por Ni-NTA se ve aumentada en presencia de tramos poli-A (5 o más residuos para DNA y 20 o más para el caso de RNA). Por otra parte, también debe tenerse en cuenta que la proteína Ebp1 utilizada a lo largo de este trabajo poseía una cola de poli-His (útil para su purificación y para la unión a la resina Ni-NTA agarosa) en el extremo N-terminal que podría influir en la interacción con los aptámeros, ya que éstos tendrían posibilidad de unirse durante el ensayo a dicha cola de poli-His en vez de a la proteína en sí. Este aspecto también ha sido estudiado por diferentes autores (Tsuji et al. 2009, Ohuchi 2014), existiendo de hecho aptámeros comerciales que se unen específicamente a poli-His.

Dado que las secuencias y/o estructuras de los aptámeros publicados en los dos casos comentados (aumento de afinidad por la resina o por la cola de poli-His) no se corresponden con las de los aptámeros obtenidos en el presente trabajo, la ineficiencia del ensayo realizado parece más relacionada con una inespecificidad por parte de los aptámeros en las condiciones utilizadas que de una verdadera afinidad de ellos por la resina Ni-NTA o por la cola de poli-His. Por tanto, resulta evidente que la tecnología SELBA, aún en desarrollo en el laboratorio, no está todavía suficientemente optimizada. Así, en el presente trabajo se decidió realizar otro tipo de ensayos que permitiesen prescindir de la resina durante las medidas de afinidad de los aptámeros por la proteína Ebp1.

5.4. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD APTÁMEROS-PROTEÍNA MEDIANTE ELONA

5.4.1. ELONA acoplado a PCR o RT-PCR a tiempo final

El primero de los ensayos de afinidad de los aptámeros de DNA por Ebp1 realizados en un soporte sin resina Ni-NTA agarosa fue el ELONA acoplado a PCR a tiempo final, que posteriormente se puso a punto para los aptámeros de RNA al acoplarlo a RT-PCR a tiempo final. Además de evitar el uso de resina, una ventaja adicional del ELONA acoplado a (RT-)PCR es que puede ser llevado a cabo en placas multipocillo. Esto permite un análisis más rápido de las muestras (en este caso, las rondas de selección/evolución) con sus correspondientes triplicados, tanto con Ebp1 como con BSA (para determinar la especificidad de los aptámeros).

En cuanto a los resultados obtenidos por esta técnica, en el caso de los aptámeros de DNA se observó claramente (a pesar de la excesiva variabilidad obtenida con algunos triplicados) la diferente afinidad y especificidad de las distintas rondas (tanto de DS como de DE) por Ebp1 y por BSA, si bien en ambos procesos se producía una notable mejora de la afinidad en la séptima ronda (DS07 y DE07). Para los aptámeros de RNA es destacable la falta de amplificación en la RT-PCR, indicando que la cantidad de moléculas de RNA recuperadas fue menor que para el DNA. Como consecuencia, resultaba evidente que era necesario modificar el protocolo de ELONA con objeto de recuperar una cantidad de aptámeros de RNA suficiente para poder amplificarlos y cuantificarlos mediante RT-PCR. De hecho, este resultado se tuvo en cuenta para la posterior realización de ELONA-RT-qPCRs, lo que llevó a incluir una serie de modificaciones en el protocolo de ELONA acoplado a RT-qPCR respecto al acoplado a qPCR.

A pesar de lo anterior, esta metodología mostró, como la descrita en el apartado anterior, una limitación relacionada con la heterogeneidad de las poblaciones presentes al final de cada ronda. Así, el efecto de muestreo hacía que se obtuvieran resultados no reproducibles con cada ronda. En principio el ELONA acoplado a PCR (o RT-PCR) a tiempo final podría haberse utilizado para el análisis de la afinidad de aptámeros individuales aislados de diferentes rondas. No obstante, como ya se mencionó en el apartado anterior, en el presente trabajo se buscaba desarrollar una metodología para evaluar la afinidad aptámero-proteína que fuese utilizable tanto con poblaciones heterogéneas como con moléculas individuales de ácidos nucleicos.

Por otra parte, esta metodología presentaba un gran inconveniente: su elevado coste temporal. En efecto, aunque tanto el ELONA como la posterior (RT-)PCR permitían un rápido

procesamiento de las muestras gracias a la utilización de placas de 96 pocillos, la realización de las electroforesis para la comprobación de los resultados de la amplificación producida en cada placa de ELONA resultaba muy laboriosa y necesariamente lenta. Además, la cuantificación de la amplificación producida se basaba en la comparación de la intensidad de las bandas en el gel de electroforesis, lo que podía verse alterado por la calidad del gel, la eficiencia del marcaje con el agente intercalante, o la captación y procesamiento de la imagen. Debido a todo ello, se decidió que lo más conveniente era poner a punto un método de análisis que fuese similar al anterior pero que evitase las electroforesis posteriores a la amplificación y permitiese la cuantificación de un modo alternativo.

5.4.2. ELONA acoplado a PCR o RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR o RT-qPCR)

Continuando con el trabajo de optimización expuesto en los puntos anteriores, tras desarrollar un método que no requería el marcaje de los aptámeros ni el uso de resina como soporte para la proteína, se buscó también una solución al coste temporal del procesamiento de los ELONAs seguidos de PCR o RT-PCR a tiempo final. Así, en este trabajo se puso a punto un método de análisis en el que el ELONA se acoplaba a PCR (o RT-PCR) cuantitativa a tiempo real. El uso de qPCR (o RT-qPCR) resulta más costoso económicamente, pero como contrapartida es más reproducible y mucho menos laborioso (una vez puestas a punto las condiciones de las amplificaciones y realizadas las correspondientes rectas patrón) que la PCR a tiempo final. El valor de Ct obtenido en una qPCR es inversamente proporcional a la cantidad inicial de molde presente en la muestra: si ésta es mayor, el número de ciclos de amplificación necesario para acumular el producto suficiente (y, por consiguiente, obtener señal fluorescente) será menor (y con ello el valor de Ct) que en el caso de comenzar con una cantidad de molde menor (Heid et al. 1996, Bustin et al. 2005). El acoplamiento del ELONA a (RT-)qPCR aúna, por tanto, la posibilidad de multiplexado en el análisis paralelo de muestras con la cuantificación directa de los aptámeros unidos a la diana y recuperados por elución. Además, este ensayo conjuga la especificidad del ELONA con la sensibilidad de la (RT-)qPCR, consiguiendo un límite de detección en el rango de nM (Pinto et al. 2009, Pinto et al. 2014).

Esta metodología resultó exitosa a lo largo del presente trabajo y se utilizó, en primer lugar, para el análisis de las rondas de selección y evolución de DNA y RNA. En estos ensayos se obtuvo en general una mayor recuperación de aptámeros (lo que evidenciaba una mayor afinidad de la población por el ligando) en la última ronda de cada proceso de selección/evolución, excepto en el caso de DE en el que la mayor recuperación se obtuvo en la penúltima ronda (Figuras R28, R29, R35 y R36). El incremento de la afinidad por la diana a lo largo de los cuatro procesos era

indicativo de un correcto desarrollo de los mismos y permitió estimar que en todos los casos 8 rondas podrían ser suficientes para la obtención de aptámeros con elevada afinidad por Ebp1 (aunque, probablemente, se podrían generar aptámeros con afinidades aún mejores si se continuaran los procesos con un número mayor de rondas). Además, las poblaciones finales de los cuatro procesos mostraron una elevada especificidad por la proteína Ebp1 frente a BSA, algo muy positivo teniendo en cuenta que el aumento de afinidad no tiene por qué implicar un incremento de la especificidad (Carothers et al. 2006).

Posteriormente al estudio de las poblaciones de cada ronda, también se realizaron los análisis por ELONA acoplado a (RT-)qPCR de los aptámeros individuales presentes en las últimas rondas de los procesos: DS08, DE08, RS08 y RE08 (Figuras R30, R31, R37 y R38). Se obtuvieron diferentes resultados en cuanto a su afinidad y especificidad frente a Ebp1, por lo que se decidió estudiar en más detalle aquellos aptámeros individuales que habían mostrado mejores resultados en este primer análisis. Así, se realizaron curvas de afinidad para cuantificar los valores de K_d y B_{max} de seis aptámeros de DNA obtenidos en los procesos DS o DE (DS0822, DS0830, DE0807, DE0816, DE0820 y DE0822) y de otros seis de RNA resultantes de los procesos RS o RE (RS0823, RS0825, RS0826, RE0823, RE0828 y RE0829), como se describe en los apartados siguientes.

5.5. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS Y ESTRUCTURAS DE LOS APTÁMEROS OBTENIDOS

El análisis de los aptámeros individuales obtenidos mediante clonaje y secuenciación a partir de las poblaciones de todas las rondas de los cuatro procesos se realizó empleando programas y servidores especializados, principalmente ClustalW (Thompson et al. 1994, Bailey et al. 2009, Blank 2016). A su vez, para determinar las estructuras secundarias en las que se pliegan *in silico* dichas secuencias se utilizaron las plataformas informáticas RNAfold (Lorenz et al. 2011) y mfold (Zuker 2003). En base a estos análisis, se estudió la aparición y progreso de las diferentes secuencias y estructuras halladas a lo largo de los procesos, tal como se proponía en algunos de los trabajos pioneros en el campo (Thompson et al. 1994, Grundy et al. 1997), y se realizó una búsqueda de hipotéticos dominios de secuencia y/o estructura que fueran comunes entre los aptámeros obtenidos. Con ello sería esperable que, desde la población inicial aleatoria, fuesen seleccionándose (o surgiendo y fijándose, en el caso de los procesos de evolución) dominios de unión a Ebp1 eventualmente comunes o semejantes en cada proceso (Joyce 1994).

Los procesos evolutivos (tanto los naturales como los llevados a cabo *in vitro*, en este caso DE y RE) introducen mutaciones al azar en los genotipos de la población (en el presente trabajo a una tasa estimada de $2,25 \times 10^{-2}$ mutaciones por nucleótido copiado), generando nuevas secuencias y aumentando con ello la heterogeneidad de la población. Por tanto, en los procesos DE y RE se buscaba una exploración constante del espacio de secuencias a lo largo de las rondas. Sin embargo, los procesos de selección *in vitro* (DS y RS) se rigen por una tasa de mutación muy baja (en el presente trabajo, estimada en $4,33 \times 10^{-6}$ errores/nt), lo que lleva al enriquecimiento de los aptámeros con mayor afinidad por la diana ya presentes en la población de partida, con escasa capacidad para explorar regiones alejadas del espacio de secuencias (Ellington and Szostak 1990, Robertson and Joyce 1990, Tuerk and Gold 1990). Esto se ha demostrado en diferentes estudios en los que se puso de manifiesto el progresivo enriquecimiento de la población en uno o más aptámeros, pudiendo clasificarse en familias más o menos relacionadas en función de su secuencia o su estructura secundaria (Sassanfar and Szostak 1993, Tanaka et al. 2009, Sanchez-Luque et al. 2014, Duclair et al. 2015). En nuestro caso, el análisis de las secuencias que se obtuvieron del clonaje molecular produjo poblaciones que, si bien mostraban secuencias repetidas al final de varias de las rondas, no permitieron (con el número de secuencias clonales analizadas) determinar el enriquecimiento progresivo de alguno de los aptámeros a lo largo de las diferentes rondas de los cuatro procesos (ver apartados 4.3-4.6 de Resultados).

En cuanto a las estructuras secundarias obtenidas, aunque no se ha encontrado ninguna mantenida globalmente en los diferentes aptámeros seleccionados, sí se han detectando ciertos motivos cortos de secuencia y estructura que podrían relacionarse con la interacción de los aptámeros con la proteína Ebp1. Se trata de fragmentos de 4 nucleótidos que forman parte de lazos de entre 4 y 8 nt, cerrados por tallos de 2 a 6 pb. En concreto, son 5 para DNA: TCTA, TGTA, GTGA, TGTC y TGTT (Tabla R11). Para RNA, los motivos detectados son 8: CGUA, GUGG, GCUC, GAUA, UGUU, CCUG, UUCA y GAUG (Tabla R13). En la Tabla D1 se muestra la prevalencia de estos 13 motivos de secuencia y estructura a lo largo de los cuatro procesos realizados. Entre ellos, podrían resultar especialmente relevantes los motivos que están presentes en aptámeros cuya unión a ligando pudo ajustarse al modelo *One site – Specific binding* y cuyos valores de K_d se situaron en el rango de 14 a 222 nM (Figuras R33 y R40): TCTA y TGTC para DNA, y GCUC, GAUA y GAUG para RNA, tal como se comentará en el apartado 5.8. A partir de los resultados de este trabajo, está previsto continuar en el laboratorio con la caracterización funcional de los aptámeros de alta afinidad por Ebp1 que contienen tales dominios de secuencia/estructura.

5. DISCUSIÓN

Tabla D1. Motivos cortos de secuencia y estructura detectados en los aptámeros individuales con mayor afinidad presentes en las poblaciones finales de los cuatro procesos (DS, DE, RS y RE).

Motivo	Presencia en aptámeros individuales de las poblaciones finales		Proceso	Presencia a lo largo de los procesos							
	<i>One site – Specific binding</i>	Otros ajustes		Rondas							
				1	2	3	4	5	6	7	8
TCTA	DE0807	DS0822	DS	0	0	0	0	1	0	0	2
			DE	0	0	0	0	0	0	0	1
			RS	0	0	0	1	3	2	0	0
			RE	1	0	0	0	1	1	0	0
TGTA		DS0830	DS	2	1	1	0	1	4	1	2
			DE	0	1	1	1	3	0	1	1
			RS	4	0	1	2	0	9	1	0
			RE	0	1	3	1	2	2	0	3
GTGA		DE0816	DS	0	3	0	0	0	0	0	0
			DE	0	1	1	1	1	0	0	1
			RS	0	0	0	0	0	1	0	0
			RE	0	0	3	0	0	1	0	0
TGTC	DE0820		DS	1	0	1	2	0	0	0	0
			DE	0	0	0	0	0	1	0	2
			RS	1	0	2	1	0	0	2	0
			RE	0	0	0	3	1	1	0	0
TGTT		DE0822	DS	2	5	1	1	0	0	2	1
UGUU		RE0823	DE	0	1	2	2	1	5	0	1
			RS	0	3	0	1	3	5	1	1
CGUA		RS0823	RE	0	0	0	1	2	2	3	3
			DS	1	0	0	0	0	0	1	0
			DE	2	0	0	0	0	0	0	0
			RS	0	0	0	0	0	0	0	1
GUGG		RS0823	RE	2	1	0	0	0	1	0	1
			DS	0	0	0	0	1	2	0	1
			DE	0	1	0	0	0	0	2	0
			RS	0	0	0	0	0	0	0	1
GCUC	RS0825		RE	0	0	2	0	0	0	0	0
			DS	0	1	0	0	0	0	0	0
			DE	0	0	1	0	0	0	0	1
			RS	0	0	0	0	1	1	0	1
GAUA	RS0826		RE	0	0	0	0	0	2	0	3
			DS	0	1	0	0	0	1	1	0
			DE	0	0	0	1	0	0	0	0
			RS	1	0	0	1	0	0	0	1
CCUG		RE0823	RE	0	0	0	0	0	1	1	0
			DS	0	0	0	0	0	0	0	0
			DE	1	0	0	0	0	0	0	0
			RS	3	0	0	0	0	0	1	0
UUCA		RE0828	RE	0	0	0	0	0	0	0	1
			DS	0	0	0	0	0	0	1	0
			DE	0	1	0	0	0	0	0	0
			RS	0	0	0	0	0	0	0	0
GAUG	RE0829		RE	1	1	0	0	0	1	0	1
			DS	0	2	0	0	0	0	0	0
			DE	0	0	0	0	0	0	0	0
			RS	0	0	0	0	1	0	0	1
			RE	0	0	0	0	0	0	0	1

En cualquier caso, debido a la heterogeneidad de las poblaciones de aptámeros de las diferentes rondas (incluida la octava), sería necesario contar con mayor cantidad de información para poder profundizar en el análisis comparativo, no realizado en ningún estudio previo, de la evolución secuencia-estructura-función de las poblaciones obtenidas por selección o evolución *in vitro* de DNA y de RNA frente a un mismo ligando. La heterogeneidad (en cuanto a las secuencias completas) observada en el análisis individual de aptámeros presentes en las últimas rondas de los cuatro procesos sugiere tanto la necesidad de llevar a cabo más rondas de selección o evolución como el interés que tendría analizar un número mayor de moléculas de cada ronda empleando sistemas de secuenciación masiva. Ambas opciones serán exploradas en trabajos futuros del laboratorio basados en los resultados del presente estudio.

5.6. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE SELECCIÓN FRENTE A EVOLUCIÓN *IN VITRO*

Como se indicó en la Introducción, hasta la fecha no se han realizado estudios sistemáticos para comparar los procesos de obtención de aptámeros frente a una misma diana mediante selección y evolución *in vitro*. Tampoco se han generado en paralelo aptámeros de DNA y de RNA frente a la misma molécula partiendo de una misma población inicial, aunque en algunos casos sí se han obtenido aptámeros de ambos ácidos nucleicos frente a una diana determinada a través de estudios diferentes o utilizando poblaciones distintas (Harada and Frankel 1995, Kubik et al. 1997, Balasubramanian et al. 1998, Berens et al. 2001, Niazi et al. 2008). Por ello, uno de los objetivos de este trabajo era comparar los procesos selectivos (DS y RS) frente a los evolutivos (DE y RE) llevados a cabo *in vitro* frente a la proteína Ebp1, comenzando desde una misma población inicial.

Para ello, empleando las estrategias indicadas en el apartado 5.2, se obtuvieron aptámeros de DNA y de RNA mediante selección y evolución *in vitro* utilizando protocolos experimentales equivalentes. Dichos aptámeros fueron procesados y analizados (secuencia, estructura, afinidad y especificidad de unión) de forma análoga y en condiciones equivalentes, permitiendo así la comparación de los cuatro procesos entre sí. Esto incluyó la utilización de la técnica ELONA, acoplada a la amplificación en tiempo real mediante qPCR o RT-qPCR, como método de determinación de la afinidad de los aptámeros por Ebp1. De hecho, es destacable la semejanza entre los rangos dinámicos y los límites de detección de ambos ensayos, lo que permitió la comparación entre los aptámeros de DNA y RNA obtenidos. Éste es uno de los resultados tecnológicos

relevantes del presente trabajo, ya que la metodología desarrollada permite analizar rondas de selección y aptámeros individuales (y, en ambos casos, tanto de DNA como de RNA) de forma unificada.

Al analizar comparativamente los resultados obtenidos, una primera diferencia que se observa entre los procesos selectivos y los evolutivos consiste en que la composición nucleotídica a lo largo de las rondas [medida como las relaciones $(A+T)/(G+C)$ o $(A+U)/(G+C)$] varió menos durante la selección *in vitro* (DS y RS, Figuras R8 y R10 respectivamente) que durante la evolución *in vitro* (DE y RE, Figuras R12 y R14). Así, en los procesos evolutivos el movimiento progresivo de la población a través del espacio de secuencias dio lugar a una tendencia globalmente creciente (proceso DE) o decreciente (proceso RE) de este parámetro. Este resultado es coherente con la lógica de los procesos de selección y evolución, en cuanto a la menor o mayor exploración del espacio de secuencias para llegar a los aptámeros con una mayor capacidad de unión a su ligando.

Por otra parte, en los procesos de selección y evolución *in vitro* es esperable que se produzca un enriquecimiento progresivo en las moléculas deseadas dentro de la población sometida a los ciclos de selección-amplificación. Esto ocurriría tras una primera etapa en la que habitualmente se produce un descenso de la cantidad de moléculas recuperadas, al aplicar por primera vez una presión selectiva (la unión a la molécula diana) a la que no se habían expuesto previamente las moléculas de la población aleatoria de partida (Marshall and Ellington 2000). En el caso de la evolución *in vitro*, la convergencia de secuencias podría ser más lenta debido a la continua exploración del espacio de secuencias como resultado de la amplificación mutagénica de las poblaciones. Sin embargo, en nuestros procesos de selección y evolución (tanto de DNA como de RNA) no se observó claramente dicho patrón de enriquecimiento a nivel de secuencias completas, dado que solamente se detectaron repeticiones de secuencias dentro de algunas rondas y no entre rondas diferentes. No obstante, la afinidad de las poblaciones por la proteína Ebp1 (partiendo de una población combinatorial inicial que resultó ser más afin por la diana en el caso del DNA –Figuras R28 y R29– que en el del RNA –Figuras R35 y R36–) sí fue creciendo a lo largo de los cuatro procesos, llegando a máximos en la ronda 8 (7 en el caso del proceso DE). Esto indica que a nivel fenotípico sí se produjo dicha convergencia hacia los aptámeros buscados. Probablemente este hecho se reflejaría también en los genotipos de las poblaciones si se continuaran los procesos más allá de las ocho rondas realizadas a lo largo de este trabajo, lo que será objeto de investigación futura en el laboratorio.

La comparación de los aptámeros de DNA obtenidos por selección y evolución *in vitro* mostró que el proceso selectivo fue más lento en cuanto al aumento de la afinidad por la proteína

Ebp1, ya que hasta la ronda DS08 no se lograron niveles claramente superiores a los de la población de partida (Figura R28). Por su parte, el proceso evolutivo estuvo asociado a un incremento neto de la afinidad de los aptámeros de DNA por la diana a partir de la ronda DE04 (Figura R29). Como consecuencia, el análisis comparativo de los resultados obtenidos por selección y evolución de DNA mostró, de forma general, una mayor afinidad en las poblaciones derivadas del proceso evolutivo (DE), siendo especialmente significativa la diferencia entre las rondas DE07 y DS07 y, en menor medida, entre las DE08 y DS08 (Figura D1).

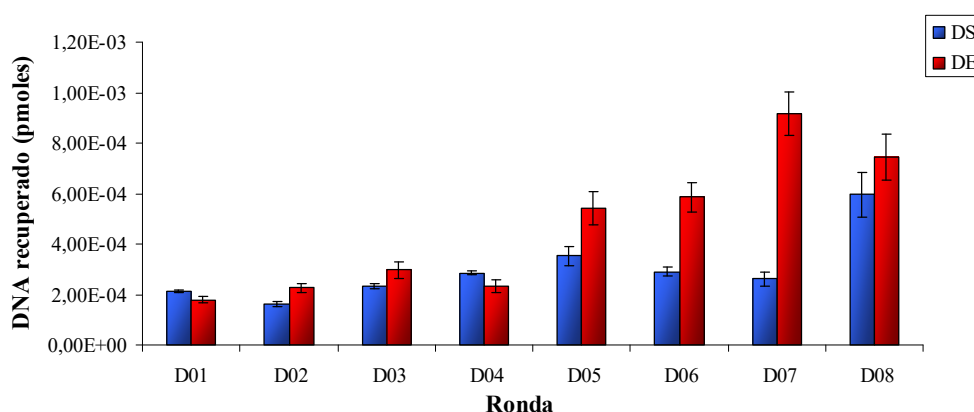


Figura D1. Comparación de la cantidad de DNA recuperado y, por tanto, de la afinidad de las poblaciones por Ebp1, utilizando la técnica de ELONA-qPCR en las ocho rondas (D01-D08) de selección y evolución (DS y DE).

En cuanto a los aptámeros individuales de DNA analizados, también éstos mostraron una mayor afinidad en el caso de los representantes de la ronda DE08 (Figuras R30 y R31). De hecho, la mayoría de los aptámeros individuales analizados procedentes de la población DE08 resultaron tener mayor afinidad por Ebp1 que la población inicial y que la media de la población DE08, lo que no se observó en el proceso DS. Más concretamente, uno de ellos (el aptámero DE0807) fue el que mostró mayor afinidad por Ebp1, empleando la técnica y las condiciones de ensayo elegidas, de todos los aptámeros de DNA analizados. Así, de los seis aptámeros de DNA con alta afinidad por Ebp1 escogidos para ser estudiados en mayor profundidad (DS0822, DS0830, DE0807, DE0816, DE0820 y DE0822, Figura R33) el mejor valor de K_d se obtuvo con DE0807 ($14,8 \pm 3,1$ nM) seguido de DE0820 ($47,6 \pm 9,7$ nM). En cuanto al proceso DS, a pesar de que al analizar los aptámeros por separado (y a una concentración fija de cada uno de ellos) DS0830 producía una señal mayor que DS0822 (Figura R30), cuando se analizó la afinidad variando la concentración de aptámero ninguno de los dos permitió un buen ajuste con el modelo de unión específica de un solo sitio. Esto mismo había ocurrido también con los aptámeros DE0816 y DE0822, cuyos datos se

ajustaban mejor a una recta (lo que impide calcular los valores de K_d y B_{max}) que a la curva de saturación esperable en este tipo de ensayos de unión aptámero-ligando.

Por su parte, con los aptámeros de RNA todas las rondas de los procesos RS y RE mostraron un aumento en la afinidad por Ebp1 respecto a la población inicial, aunque sin una tendencia clara a lo largo del proceso (Figuras R35 y R36). Dicho incremento fue especialmente llamativo en el caso de la ronda RS08, lo que explica la diferencia tan significativa de afinidad por la proteína entre las rondas RS08 y RE08 (Figura D2). Como consecuencia, sería esperable que los aptámeros individuales de RS08 analizados mostrasen una mayor afinidad por Ebp1 que los correspondientes a RE08. Sin embargo, la afinidad obtenida analizando aptámeros a una concentración fija (Figuras R37 y R38) no mostró una superioridad clara de los aptámeros de RS frente a los de RE. En cualquier caso, si nos fijamos en los análisis mediante ELONA-RT-qPCR realizados con los aptámeros RS0823, RS0825, RS0826, RE0823, RE0828 y RE0829 (Figura R40), la mejor afinidad (aunque un orden de magnitud peor que la del mejor aptámero obtenido por evolución *in vitro* de DNA) se consiguió con RS0826 ($K_d = 150,2 \pm 12,6$ nM), seguido de RE0829 ($177,6 \pm 13,5$ nM) y de RS0825 ($K_d = 222,2 \pm 20,8$ nM). Al igual que ocurrió con los aptámeros de DNA, algunos de los de RNA (RS0823, RE0823 y RE0828) tampoco mostraron saturación en los ensayos realizados, en cuyo caso el ajuste más correcto fue el de una recta.

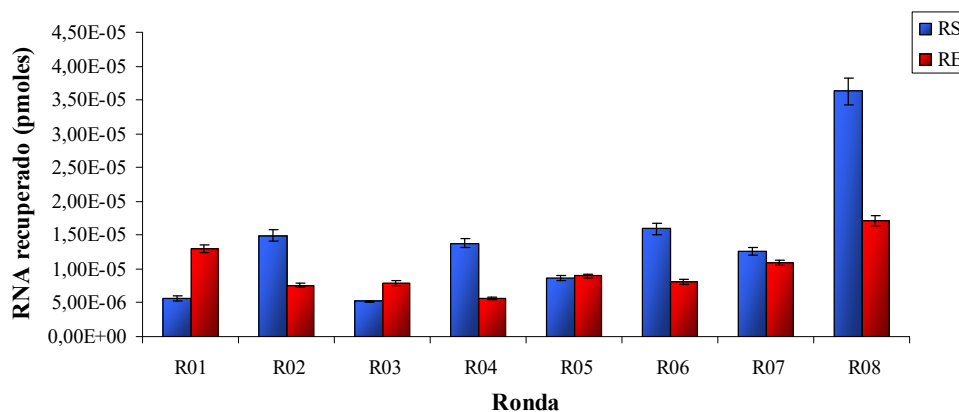


Figura D2. Comparación de la cantidad de RNA recuperado y, por tanto, de la afinidad de las poblaciones por Ebp1, utilizando la técnica de ELONA-RT-qPCR en las ocho rondas (R01-R08) de selección y evolución (RS y RE). Se observa una clara superioridad de la ronda RS08 sobre las demás.

En resumen, en el sistema experimental utilizado la ventaja del proceso evolutivo respecto al selectivo fue clara para la obtención de aptámeros de DNA. Por el contrario, para los aptámeros de RNA se observó una mejora de la afinidad durante el proceso selectivo frente al evolutivo.

5.7. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE DNA FRENTE A RNA

Como se comentó en la Introducción, la proteína Ebp1 es requerida de manera natural por el IRES de FMDV para iniciar la traducción independiente de *cap* de dicho genoma (Pilipenko et al. 2000). También se indicó que esta proteína no solamente es capaz de unirse a RNA sino también a DNA (Zhang and Hamburger 2004), por lo que *a priori* no puede hacerse una estimación de cuál de los ácidos nucleicos podría ofrecer mejores resultados en cuanto a su afinidad de unión a Ebp1.

De modo análogo a la comparación entre los procesos selectivos y evolutivos mostrada en el apartado anterior, se compararon las afinidades de los aptámeros de DNA y de RNA por Ebp1 mediante ELONA acoplado a qPCR o a RT-qPCR, tanto durante la selección *in vitro* (Figura D3) como en la evolución *in vitro* (Figura D4).

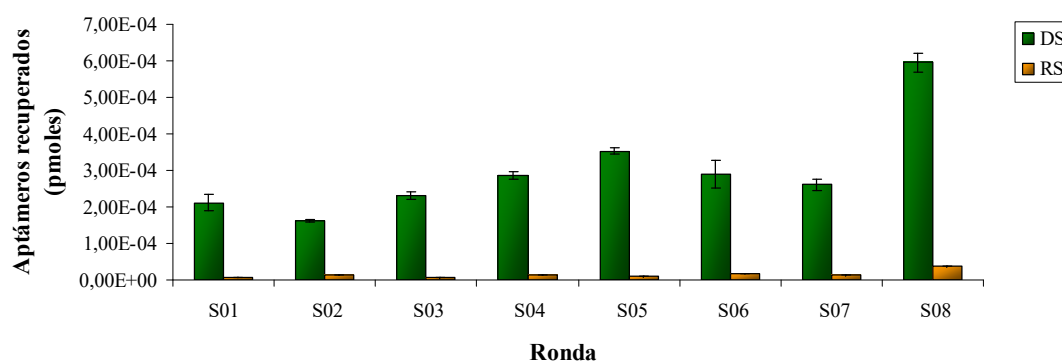


Figura D3. Comparación de la cantidad de DNA (verde) o RNA (naranja) recuperado del ELONA acoplado a (RT-)qPCR en las ocho rondas de selección *in vitro* (S01-S08). La mayor afinidad de las poblaciones de DNA por Ebp1 es clara en todas las rondas, sobre todo en la última.

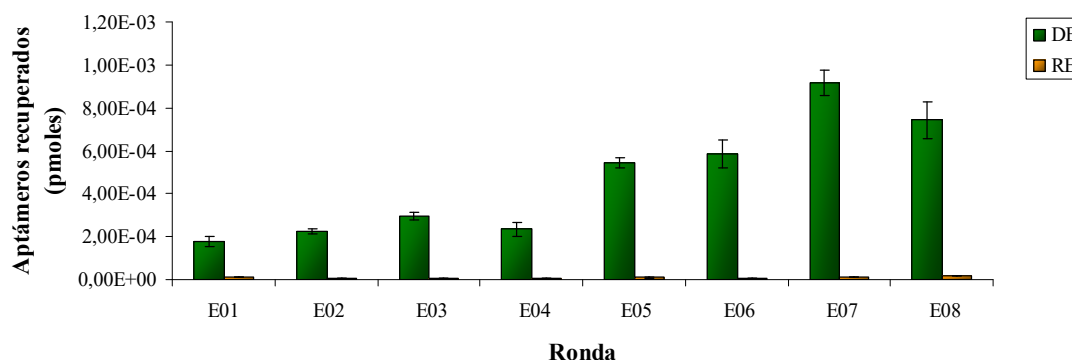


Figura D4. Comparación de la cantidad de DNA (verde) o RNA (naranja) recuperado del ELONA acoplado a (RT-)qPCR en las ocho rondas de evolución *in vitro* (E01-E08). La mayor afinidad de las poblaciones de DNA por Ebp1 es evidente en todas las rondas de ambos procesos.

En la Figura D3 se observa una recuperación de DNA considerablemente mayor que de RNA a lo largo del proceso de selección *in vitro*. Del mismo modo, la Figura D4 muestra la mayor afinidad de las rondas de DNA con respecto a las de RNA en el caso de los procesos de evolución *in vitro*. La aparente superioridad de los aptámeros de DNA frente a los de RNA se produjo a pesar de las modificaciones experimentales introducidas entre ambos procesos: fue necesario modificar el protocolo de ELONA para RNA respecto al de DNA, dejando incubar durante más tiempo la proteína Ebp1 con la placa de ensayo (y permitiendo así una mayor adhesión de Ebp1) y se realizaron menos lavados (reduciéndose la astringencia de cada etapa de selección). Estas mismas consideraciones son también aplicables a los resultados de los análisis de afinidad realizados con los aptámeros individuales de la octava ronda de cada caso (Figuras R30, R31, R37 y R38).

En cuanto a los ensayos de saturación realizados con los aptámeros individuales más afines por Ebp1 obtenidos de las últimas rondas (Figura R33 para DNA y R40 para RNA), los mejores aptámeros de DNA y RNA mostraron, respectivamente, $K_d = 14,8 \pm 3,1$ nM (DE0807) y $K_d = 150,2 \pm 12,6$ nM (RS0826). Por tanto, en conjunto puede afirmarse que los aptámeros de DNA obtenidos a lo largo de este trabajo mostraron una mejor afinidad por Ebp1 que los de RNA.

5.8. FUNCIONALIDAD DE LOS APTÁMEROS ANTI-EBP1 OBTENIDOS

Desde el punto de vista de la investigación aplicada, el objetivo último de la realización de un proceso de selección o evolución *in vitro* de ácidos nucleicos, en este caso aptámeros, es la obtención de oligonucleótidos de DNA o RNA capaces de unirse al ligando deseado con elevada afinidad y especificidad. En el presente trabajo, los parámetros que caracterizan la unión aptámero-Ebp1 se analizaron mediante ensayos de ELONA acoplados a qPCR (para DNA) o a RT-qPCR (para RNA). Esto permitió realizar un estudio comparativo entre los procesos de selección y evolución *in vitro* y entre aptámeros de DNA y de RNA, tal como se expuso anteriormente. En este apartado se profundizará en la comparación entre los aptámeros individuales escogidos al final de los procesos DS, DE, RS y RE, de los que se calcularon sus valores de K_d , B_{max} y especificidad (afinidad frente a Ebp1 respecto a BSA). Para ello se eligieron los 12 aptámeros con mayor afinidad de los obtenidos por clonaje molecular: DS0822, DS0830, DE0807, DE0816, DE0820, DE0822, RS0823, RS0825, RS0826, RE0823, RE0828 y RE0829.

Los resultados (Figuras R33 para DNA y R40 para RNA) mostraron valores de afinidad en el rango de nM, en concordancia con los descritos en la bibliografía existente para otras dianas comparables (Kubik et al. 1994, Kulbachinskiy 2007, Niazi et al. 2008, Chen et al. 2009, Bing et al.

2010, Lamont et al. 2011). Se observó una mejor afinidad de los aptámeros DE0807 [$K_d = 14,8 \pm 3,1$ nM, $B_{max} = 1,3 \pm 0,1$ nM, con R^2 (ajuste al modelo *One site – Specific binding*) = 0,9540] y DE0820 [$K_d = 47,6 \pm 9,7$ nM, $B_{max} = 2,2 \pm 0,1$ nM, con $R^2 = 0,9753$] sobre los demás. Por su parte, los valores de afinidad de los aptámeros de RNA fueron un orden de magnitud peores que los de DNA, siendo el mejor de ellos RS0826 ($K_d = 150,2 \pm 12,6$ nM, $B_{max} = 0,35 \pm 0,02$ nM, con $R^2 = 0,9901$).

En general, las diferencias en la afinidad de los aptámeros se deben a la distinta interacción entre éstos y su diana. Así, a falta de un análisis más exhaustivo que será realizado en el futuro en el laboratorio, los resultados de este trabajo indican que (como se muestra en las Tablas R11, R13 y D1, así como en las Figuras R32, R33, R39 y R40) el motivo TCTA en un lazo desapareado de 4 nt cerrado por un tallo de 4 pb (presente en el aptámero DE0807) permitiría una mejor interacción de los aptámeros de DNA con Ebp1 que si ese mismo motivo TCTA forma parte de un lazo de 8 nt cerrado por 3 pb (tal como aparece en el aptámero DS0822). A pesar de esa diferencia, es destacable el hecho de que los procesos evolutivo y selectivo de DNA hayan convergido en su octava ronda hacia motivos similares, conteniendo el tetranucleótido TCTA desapareado en una estructura tallo-lazo. El análisis de la presencia de este tipo de motivos a lo largo de las diferentes rondas de los cuatro procesos (ver Tabla A6 del Apéndice III y Tabla D1) ha mostrado su aparición en diferentes rondas de los mismos, y más en los procesos de RNA que en los de DNA, pero en ningún caso con la conformación de 4 nt desapareados observada en el aptámero DE0807, lo que apoyaría la hipótesis de que esta estructura favorecería especialmente la interacción con Ebp1. Adicionalmente, el motivo TGTC (presente en el aptámero DE0820 en un lazo de 5 nt cerrado por un tallo de 3 pb) también puede ser relevante para la interacción con Ebp1. En los demás motivos presentes en los aptámeros de DNA, se observa un aumento de su prevalencia (Tabla D1) en el proceso DE.

En el caso de los aptámeros de RNA obtenidos, los motivos GAUA (presente en el aptámero RS0826 en un lazo de 4 nt cerrado por un tallo de 8 pb interrumpido por una burbuja interna de 2 nt) y GAUG (aptámero RE0829, en un lazo de 5 nt cerrado por un tallo de 10 pb interrumpido por una burbuja interna de 1 nt), que son muy similares entre sí, también parecen proporcionar una mayor capacidad de unión con Ebp1, aunque en menor grado que en el caso de los aptámeros de DNA. Los demás motivos de RNA identificados (Tabla D1) muestran una tendencia variable en la que es especialmente llamativo el aumento de los motivos UGUU y GCUC en el proceso RE. Además, es destacable el hecho de que (como se muestra en la Tabla D1) el principal motivo presente en uno de los aptámeros de DNA con alta afinidad por Ebp1 (TGTT, en DE0822)

aparezca también, en su versión equivalente, en un aptámero de RNA con elevada afinidad por la proteína (UGUU, en RE0823), siendo ambos el resultado de procesos de evolución *in vitro*.

En cualquier caso es necesario tener en cuenta que, además de los motivos concretos señalados, el resto de la secuencia y estructura de cada uno de los aptámeros obtenidos también puede intervenir, de forma más o menos directa, en su interacción con el ligando. En el laboratorio se tiene previsto realizar en el futuro los estudios adicionales necesarios, combinando aproximaciones *in vitro* e *in silico* análogas a las previamente empleadas con éxito por el grupo y sus colaboradores (Sánchez-Luque et al. 2014), que podrían conducir a la obtención de los aptámeros mínimos capaces de interaccionar de forma óptima con la proteína Ebp1.

Por otra parte, si se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con los aptámeros desarrollados frente a FMDV (Ellingham et al. 2006), se pone de manifiesto la alta afinidad de varios de nuestros aptámeros anti-Ebp1. Así, los valores de K_d de los mejores aptámeros de RNA frente a la polimerasa 3D de FMDV, cuantificados mediante ensayos de inmovilización/precipitación (Ellingham et al. 2006), fueron 460 nM para el aptámero F38, 375 nM para el F47 y 625 nM para el F52, frente al rango de K_d de 15 a 222 nM de los mejores aptámeros desarrollados en el presente trabajo.

5.9. VISUALIZACIÓN MEDIANTE AFM DE LA CONFORMACIÓN EN CONDICIONES NATIVAS DEL IRES DE FMDV, LA PROTEÍNA EBP1 Y COMPLEJOS IRES-EBP1

El análisis mediante AFM (en modo *tapping*, al aire) del IRES de FMDV (Figuras R41 y R42) y de la proteína Ebp1 (Figura R43) por separado, en condiciones nativas y a temperatura ambiente, mostró una clara diferencia en cuanto a la conformación tridimensional de ambas moléculas. Así, el IRES de FMDV, cuyo plegamiento funcional está condicionado por la presencia de iones Mg^{2+} en el tampón de trabajo, se mostró como una estructura plegada y con topología generalmente angular, similar a la observada mediante AFM por nuestro grupo para el IRES del virus de la hepatitis C en las mismas condiciones iónicas (García-Sacristán et al. 2014). Este hecho es relevante porque la concentración de Mg^{2+} influye especialmente sobre el plegamiento del dominio 3 del IRES de FMDV (al que se une Ebp1), lo que a su vez puede influir en su unión posterior a otras proteínas. De hecho, si bien la estructura secundaria del IRES de FMDV es estable incluso en ausencia de cationes divalentes, la presencia de iones Mg^{2+} se requiere para el establecimiento de elementos de estructura terciaria que resultan esenciales para la funcionalidad de la molécula (Fajardo et al. 2012, Lozano et al. 2014). No obstante, aún no existen modelos

tridimensionales de la estructura del IRES de FMDV, a excepción del modelo *in silico* desarrollado por Burks y sus colaboradores (Fitzgerald and Semler 2009, Burks et al. 2011). Por ello resultaba oportuno comenzar a lo largo de este trabajo la caracterización morfológica, en condiciones nativas, del elemento IRES de FMDV mediante AFM. A su vez, la visualización por AFM de la proteína Ebp1 mostró una morfología globular y muy homogénea en las condiciones ensayadas, lo que resulta compatible con la estructura tridimensional obtenida por difracción de rayos X de la proteína (Monie et al. 2007), tal como se muestra en la Introducción de este trabajo (Figura I15).

En cuanto a la visualización de complejos eventualmente formados por la interacción del IRES de FMDV con Ebp1, las imágenes preliminares obtenidas a lo largo del presente trabajo (Figuras R44 y R45) mostraron agregados moleculares de mayor tamaño que los observados con las moléculas por separado, y detectables a menor densidad superficial que en el caso de las imágenes de las moléculas individuales. Esto podría constituir una prueba indirecta de la interacción entre el IRES y Ebp1, lo que estaría reforzado por el hecho de que, en ocasiones, se visualizan complejos moleculares aparentemente formados por ambas moléculas. No obstante, en este trabajo únicamente fue posible detectar esa posible interacción en algunas de las preparaciones, lo que podría deberse al cambio de conformación del IRES de FMDV inducido por la unión a la proteína Ebp1 (Yu et al. 2011). Tal como se ha previsto en el laboratorio, tras la finalización del presente trabajo se continuará con la caracterización mediante AFM de la conformación del elemento IRES de FMDV, la proteína Ebp1 y los complejos IRES-Ebp1. Además, se estudiará cómo puede afectar a la formación de dichos complejos la interacción con la proteína Ebp1 de algunos de los aptámeros de alta afinidad desarrollados a lo largo de este trabajo. Con ello se podrá seguir profundizando en las relaciones secuencia-estructura-función de los aptámeros de RNA y DNA que se unen específicamente a la proteína Ebp1.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos en el presente trabajo son las siguientes:

- 1) Se ha establecido un método para introducir mutaciones al azar durante la amplificación por PCR, cuya tasa de error asociada resulta adecuada a los procesos de evolución *in vitro* de DNA y RNA frente a la proteína Ebp1. Con este sistema, las mutaciones se introducen de forma uniforme a lo largo de la secuencia de los aptámeros y no se producen sesgos composicionales en ellos.
- 2) Se ha realizado por primera vez una comparación sistemática de los procesos de selección y evolución *in vitro*, tanto de aptámeros de DNA como de RNA. El análisis de 8 rondas en cada uno de los procesos ha mostrado que, en las condiciones empleadas, los aptámeros de DNA obtenidos presentan una afinidad significativamente mayor que los de RNA frente a Ebp1. El proceso evolutivo ha resultado más eficiente que el selectivo para la obtención de aptámeros de DNA, mientras que los aptámeros de RNA con mayor afinidad por su diana han sido obtenidos mediante selección *in vitro*.
- 3) La metodología de ELONA acoplado a (RT-)qPCR ha mostrado una gran reproducibilidad, eficiencia y nivel de resolución para la caracterización directa y sin necesidad de marcaje de la afinidad y especificidad de los aptámeros de DNA y RNA por la proteína Ebp1. La utilidad de la tecnología puesta a punto en este trabajo se ha demostrado tanto con las poblaciones producidas en cada ronda como con los aptámeros individuales identificados por clonaje molecular.
- 4) Se han obtenido aptámeros de DNA y de RNA con alta afinidad por la proteína Ebp1. En particular, los aptámeros de DNA denominados DE0807 y DE0820 han mostrado una K_d en torno a 15 y 48 nM, respectivamente, hacia dicha proteína en las condiciones ensayadas.
- 5) Se han identificado motivos cortos de secuencia y estructura, conteniendo tetranucleótidos desapareados, dentro de los aptámeros de DNA y RNA con mayor afinidad por Ebp1. Estos motivos podrían estar implicados en la interacción con la proteína de los aptámeros que los contienen.
- 6) Se ha analizado por primera vez la estructura tridimensional nativa del elemento IRES de FMDV y de la proteína Ebp1 empleando microscopía de fuerza atómica. Se han dado los primeros pasos para visualizar, mediante esta tecnología, la posible formación de complejos IRES-Ebp1 y su eventual alteración por los aptámeros anti-Ebp1 desarrollados.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff, M. D., P. J. Magelhaes and S. J. Ram (2004). "{Image processing with ImageJ}." *Biophotonics Int* **11**(7): 36-42.
- Agrawal, S., J. Goodchild, M. P. Civeira, A. H. Thornton, P. S. Sarin and P. C. Zamecnik (1988). "Oligodeoxynucleoside phosphoramidates and phosphorothioates as inhibitors of human immunodeficiency virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(19): 7079-7083.
- Aguirre, J., J. M. Buldu, M. Stich and S. C. Manrubia (2011). "Topological structure of the space of phenotypes: the case of RNA neutral networks." *PLoS ONE* **6**(10): 18.
- Allison, D. P., N. P. Mortensen, C. J. Sullivan and M. J. Doktycz (2010). "Atomic force microscopy of biological samples." *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2**(6): 618-634.
- Ambagala, A. P., T. Bosma, M. A. Ali, M. Poustovoitov, J. J. Chen, M. D. Gershon, P. D. Adams and J. I. Cohen (2009). "Varicella-zoster virus immediate-early 63 protein interacts with human antisilencing function 1 protein and alters its ability to bind histones h3.1 and h3.3." *J Virol* **83**(1): 200-209.
- Ambros, V. and D. Baltimore (1980). "Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA." *J Biol Chem* **255**(14): 6739-6744.
- Ambros, V., R. F. Pettersson and D. Baltimore (1978). "An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein." *Cell* **15**(4): 1439-1446.
- Aquino-Jarquín, G. and J. D. Toscano-Garibay (2011). "RNA aptamer evolution: two decades of SELEction." *Int J Mol Sci* **12**(12): 9155-9171.
- Arenas, C. D. and N. Lehman (2010). "The continuous evolution in vitro technique." *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **9**(9): 1-17.
- Avci-Adali, M., A. Paul, N. Wilhelm, G. Ziemer and H. P. Wendel (2009). "Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation." *Molecules* **15**(1): 1-11.
- Bachrach, H. L. (1977). Foot-and-mouth disease virus, properties, molecular biology and immunogenicity. Beltsville Symposia in Agricultural Research. I. Virology in Agriculture. R. J. A. (Ed.): 3-32.
- Bailey, T. L., M. Boden, F. A. Buske, M. Frith, C. E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W. W. Li and W. S. Noble (2009). "MEME Suite: tools for motif discovery and searching." *Nucleic Acids Research* **37**(suppl 2): W202-W208.
- Balasubramanian, V., L. T. Nguyen, S. V. Balasubramanian and M. Ramanathan (1998). "Interferon-gamma-inhibitory oligodeoxynucleotides alter the conformation of interferon-gamma." *Mol Pharmacol* **53**(5): 926-932.
- Baltimore, D. (1970). "Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses." *Nature* **226**(5252): 1209-1211.
- Barfod, A., T. Persson and J. Lindh (2009). "In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1." *Parasitol Res* **105**(6): 1557-1566.
- Bartel, D. P. and J. W. Szostak (1993). "Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]." *Science* **261**(5127): 1411-1418.
- Barton, N. H., Briggs D.E.G., Eisen J.A., Goldstein D.B., Patel N.H. (2007). Evolution, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bayrac, A. T., K. Sefah, P. Parekh, C. Bayrac, B. Gulbakan, H. A. Oktem and W. Tan (2011). "In Vitro Selection of DNA Aptamers to Glioblastoma Multiforme." *ACS Chemical Neuroscience* **2**(3): 175-181.
- Beaucage, S. L. and R. P. Iyer (1992). "Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach." *Tetrahedron* **48**(12): 2223-2311.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bebenek, K., J. D. Roberts and T. A. Kunkel (1992). "The effects of dNTP pool imbalances on frameshift fidelity during DNA replication." *J Biol Chem* **267**(6): 3589-3596.
- Beckman, R. A., A. S. Mildvan and L. A. Loeb (1985). "On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro." *Biochemistry* **24**(21): 5810-5817.
- Beinoravičiūtė-Kellner, R., G. Lipps and G. Krauss (2005). "In vitro selection of DNA binding sites for ABF1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*." *Febs Letters* **579**(20): 4535-4540.
- Belsham, G. J. (2005). "Translation and replication of FMDV RNA." *Curr Top Microbiol Immunol* **288**: 43-70.
- Belyaeva, T. A., C. Nicol, O. Cesur, G. Trave, G. E. Blair and N. J. Stonehouse (2014). "An RNA Aptamer Targets the PDZ-Binding Motif of the HPV16 E6 Oncoprotein." *Cancers (Basel)* **6**(3): 1553-1569.
- Bell, C., E. Lynam, D. J. Landfair, N. Janjic and M. E. Wiles (1999). "Oligonucleotide NX1838 inhibits VEGF165-mediated cellular responses in vitro." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**(9): 533-542.
- Bellecave, P., M. L. Andreola, M. Ventura, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak and T. Astier-Gin (2003). "Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis in vitro." *Oligonucleotides* **13**(6): 455-463.
- Bentham, M., K. Holmes, S. Forrest, D. J. Rowlands and N. J. Stonehouse (2012). "Formation of higher-order foot-and-mouth disease virus 3D(pol) complexes is dependent on elongation activity." *J Virol* **86**(4): 2371-2374.
- Berens, C., A. Thain and R. Schroeder (2001). "A tetracycline-binding RNA aptamer." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **9**(10): 2549-2556.
- Berezovski, M. V., M. U. Musheev, A. P. Drabovich, J. V. Jitkova and S. N. Krylov (2006). "Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides." *Nat Protoc* **1**(3): 1359-1369.
- Beringer, M. and M. V. Rodnina (2007). "The ribosomal peptidyl transferase." *Mol Cell* **26**(3): 311-321.
- Bianchini, M., M. Radrizzani, M. G. Brocardo, G. B. Reyes, C. Gonzalez Solveyra and T. A. Santa-Coloma (2001). "Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein." *J Immunol Methods* **252**(1-2): 191-197.
- Bing, T., X. Yang, H. Mei, Z. Cao and D. Shangguan (2010). "Conservative secondary structure motif of streptavidin-binding aptamers generated by different laboratories." *Bioorg Med Chem* **18**(5): 1798-1805.
- Binnig, G., C. F. Quate and C. Gerber (1986). "Atomic force microscope." *Phys Rev Lett* **56**(9): 930-933.
- Binning, J. M., D. W. Leung and G. K. Amarasinghe (2012). "Aptamers in virology: recent advances and challenges." *Front Microbiol* **3**: 29.
- Blank, M. (2016). Next-Generation Analysis of Deep Sequencing Data: Bringing Light into the Black Box of SELEX Experiments. *Nucleic Acid Aptamers*. G. Mayer, Springer New York. **1380**: 85-95.
- Bock, C., et al. (2004). "Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis." *Proteomics* **4**(3): 609-618.
- Bock, L. C., L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas and J. J. Toole (1992). "Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin." *Nature* **355**(6360): 564-566.
- Bose, S. K., T. K. Sengupta, S. Bandyopadhyay and E. K. Spicer (2006). "Identification of Ebp1 as a component of cytoplasmic bcl-2 mRNP (messenger ribonucleoprotein particle) complexes." *Biochem J* **396**(1): 99-107.
- Breaker, R. R. (1997). "DNA enzymes." *Nat Biotech* **15**(5): 427-431.
- Bridonneau, P., Y. F. Chang, A. V. Buvoli, D. O'Connell and D. Parma (1999). "Site-directed selection of oligonucleotide antagonists by competitive elution." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **9**(1): 1-11.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Briones, C. and M. Moreno (2012). "Applications of peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs) in biosensor development." *Anal Bioanal Chem* **402**(10): 3071-3089.
- Briones, C., M. Stich and S. C. Manrubia (2009). "The dawn of the RNA World: toward functional complexity through ligation of random RNA oligomers." *RNA* **15**(5): 743-749.
- Brooksby, J. B. (1958). "The virus of foot-and-mouth disease." *Adv Virus Res*(5): 1-37.
- Brooksby, J. B. R., J. (1957). Methods used in typing the virus of Foot-and mouth disease at Pirbright, 1950–55. Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease virus: Project No. 208. Paris: European Productivity Agency of the Organization of European Cooperation (OEEC).
- Bruno, J. G. (1997). "In vitro selection of DNA to chloroaromatics using magnetic microbead-based affinity separation and fluorescence detection." *Biochem Biophys Res Commun* **234**(1): 117-120.
- Bruno, J. G. (2015). "Predicting the Uncertain Future of Aptamer-Based Diagnostics and Therapeutics." *Molecules* **20**(4): 6866-6887.
- Burke, D. H., L. Scates, K. Andrews and L. Gold (1996). "Bent pseudoknots and novel RNA inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) reverse transcriptase." *J Mol Biol* **264**(4): 650-666.
- Burke, J. M. and A. Berzal-Herranz (1993). "In vitro selection and evolution of RNA: applications for catalytic RNA, molecular recognition, and drug discovery." *FASEB J* **7**(1): 106-112.
- Burks, J. M., C. Zwieb, F. Muller, I. K. Wower and J. Wower (2011). "In silico analysis of IRES RNAs of foot-and-mouth disease virus and related picornaviruses." *Arch Virol* **156**(10): 1737-1747.
- Burmeister, P. E., et al. (2005). "Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF." *Chem Biol* **12**(1): 25-33.
- Bustin, S. A., V. Benes, T. Nolan and M. W. Pfaffl (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." *J Mol Endocrinol* **34**(3): 597-601.
- Cadwell, R. C. and G. F. Joyce (1992). "Randomization of genes by PCR mutagenesis." *PCR Methods Appl* **2**(1): 28-33.
- Cadwell, R. C. and G. F. Joyce (1994). "Mutagenic PCR." *PCR Methods Appl* **3**(6): S136-140.
- Cai, Y. H. and H. Huang (2012). "Advances in the study of protein-DNA interaction." *Amino Acids* **43**(3): 1141-1146.
- Carothers, J. M., S. C. Oestreich and J. W. Szostak (2006). "Aptamers selected for higher-affinity binding are not more specific for the target ligand." *J Am Chem Soc* **128**(24): 7929-7937.
- Carrillo, C., E. R. Tulman, G. Delhon, Z. Lu, A. Carreno, A. Vagnozzi, G. F. Kutish and D. L. Rock (2005). "Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus." *J Virol* **79**(10): 6487-6504.
- Cech, T. R. (1983). "RNA splicing: three themes with variations." *Cell* **34**(3): 713-716.
- Cech, T. R. (1986). "RNA as an enzyme." *Sci Am* **255**(5): 64-75.
- Cech, T. R. (1990). "Self-splicing of group I introns." *Annu Rev Biochem* **59**: 543-568.
- Cline, J., J. C. Braman and H. H. Hogrefe (1996). "PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." *Nucleic Acids Res* **24**(18): 3546-3551.
- Coia, G., G. Kopsidas and M. Sleight (2009). Mutagenesis methods using ribavirin and/or rna replicases, Google Patents.
- Colas, P., B. Cohen, T. Jessen, I. Grishina, J. McCoy and R. Brent (1996). "Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2." *Nature* **380**(6574): 548-550.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Collett, J. R., E. J. Cho and A. D. Ellington (2005a). "Production and processing of aptamer microarrays." *Methods* **37**(1): 4-15.
- Collett, J. R., E. J. Cho, J. F. Lee, M. Levy, A. J. Hood, C. Wan and A. D. Ellington (2005b). "Functional RNA microarrays for high-throughput screening of antiprotein aptamers." *Anal Biochem* **338**(1): 113-123.
- Conrad, R. C., S. Baskerville and A. D. Ellington (1995). "In vitro selection methodologies to probe RNA function and structure." *Mol Divers* **1**(1): 69-78.
- Coulter, L. R., M. A. Landree and T. A. Cooper (1997). "Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection." *Mol Cell Biol* **17**(4): 2143-2150.
- Cox, J. C., P. Rudolph and A. D. Ellington (1998). "Automated RNA selection." *Biotechnol Prog* **14**(6): 845-850.
- Crick, F. H. (1968). "The origin of the genetic code." *J Mol Biol* **38**(3): 367-379.
- Crowe, M. A. and J. D. Sutherland (2006). "Reaction of cytidine nucleotides with cyanoacetylene: support for the intermediacy of nucleoside-2',3'-cyclic phosphates in the prebiotic synthesis of RNA." *Chembiochem* **7**(6): 951-956.
- Cruz-Toledo, J., M. McKeague, X. Zhang, A. Giamberardino, E. McConnell, T. Francis, M. C. DeRosa and M. Dumontier (2012). "Aptamer Base: a collaborative knowledge base to describe aptamers and SELEX experiments." *Database (Oxford)* **2012**: bas006.
- Chang, L. M. and F. J. Bollum (1973). "A comparison of associated enzyme activities in various deoxyribonucleic acid polymerases." *J Biol Chem* **248**(10): 3398-3404.
- Chard, L. S., M. E. Bordeleau, J. Pelletier, J. Tanaka and G. J. Belsham (2006). "Hepatitis C virus-related internal ribosome entry sites are found in multiple genera of the family Picornaviridae." *J Gen Virol* **87**(Pt 4): 927-936.
- Chen, F., Y. Hu, D. Li, H. Chen and X. L. Zhang (2009). "CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2." *PLoS One* **4**(12): e8142.
- Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*." *Journal of Bacteriology* **127**(3): 1550-1557.
- Chyba, C. and C. Sagan (1992). "Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life." *Nature* **355**(6356): 125-132.
- Dapp, M. J., C. L. Clouser, S. Patterson and L. M. Mansky (2009). "5-Azacytidine can induce lethal mutagenesis in human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **83**(22): 11950-11958.
- Darwin, C. (1859). On the Origin of Species by Means of Natural Selection, Or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life, J. Murray.
- Darwin, C. (1871). Letter to Hooker 1 February 1871. The Life and Letters of Charles Darwin E. F. Darwin. London, John Murray, 1887.
- Dausse, E., S. Taouji, L. Evade, C. Di Primo, E. Chevet and J. J. Toulme (2011). "HAPIScreen, a method for high-throughput aptamer identification." *J Nanobiotechnology* **9**(25): 1477-3155.
- Davis, K. A., B. Abrams, Y. Lin and S. D. Jayasena (1996). "Use of a High Affinity DNA Ligand in Flow Cytometry." *Nucleic Acids Research* **24**(4): 702-706.
- Djordjevic, M. (2007). "SELEX experiments: new prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways." *Biomol Eng* **24**(2): 179-189.
- Dobbelstein, M. and T. Shenk (1995). "In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries." *J Virol* **69**(12): 8027-8034.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Doggrell, S. A. (2005). "Pegaptanib: the first antiangiogenic agent approved for neovascular macular degeneration." *Expert Opin Pharmacother* **6**(8): 1421-1423.
- Doherty, E. A. and J. A. Doudna (2000). "Ribozyme structures and mechanisms." *Annu Rev Biochem* **69**: 597-615.
- Domingo, E. and J. J. Holland (1997). "RNA virus mutations and fitness for survival." *Annu Rev Microbiol* **51**: 151-178.
- Domingo, E., D. Sabo, T. Taniguchi and C. Weissmann (1978). "Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population." *Cell* **13**(4): 735-744.
- Donaldson, A. I., C. F. Gibson, R. Oliver, C. Hamblin and R. P. Kitching (1987). "Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains." *Res Vet Sci* **43**(3): 339-346.
- Dorsch-Hasler, K., Y. Yogo and E. Wimmer (1975). "Replication of picornaviruses. I. Evidence from in vitro RNA synthesis that poly(A) of the poliovirus genome is genetically coded." *J Virol* **16**(6): 1512-1517.
- Dougan, H., D. M. Lyster, C. V. Vo, A. Stafford, J. I. Weitz and J. B. Hobbs (2000). "Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood." *Nucl Med Biol* **27**(3): 289-297.
- Drolet, D. W., L. Moon-McDermott and T. S. Romig (1996). "An enzyme-linked oligonucleotide assay." *Nat Biotech* **14**(8): 1021-1025.
- Dube, D. K. and L. A. Loeb (1975). "Manganese as a mutagenic agent during in vitro DNA synthesis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **67**(3): 1041-1046.
- Dubertret, B., S. Liu, Q. Ouyang and A. Libchaber (2001). "Dynamics of DNA-Protein Interaction Deduced from in vitro DNA Evolution." *Phys Rev Lett* **86**(26): 6022-6025.
- Duclair, S., A. Gautam, A. Ellington and V. R. Prasad (2015). "High-affinity RNA Aptamers Against the HIV-1 Protease Inhibit Both In Vitro Protease Activity and Late Events of Viral Replication." *Mol Ther Nucleic Acids* **4**: e228.
- Eckert, K. A. and T. A. Kunkel (1990). "High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase." *Nucleic Acids Res* **18**(13): 3739-3744.
- Eckert, K. A. and T. A. Kunkel (1991). "DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction." *PCR Methods Appl* **1**(1): 17-24.
- Eigen, M. (1971). "Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules." *Naturwissenschaften* **58**(10): 465-523.
- El-Deiry, W. S., K. M. Downey and A. G. So (1984). "Molecular mechanisms of manganese mutagenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**(23): 7378-7382.
- El Kirat, K., I. Burton, V. Dupres and Y. F. Dufrene (2005). "Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy." *J Microsc* **218**(Pt 3): 199-207.
- Elghanian, R., J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger and C. A. Mirkin (1997). "Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles." *Science* **277**(5329): 1078-1081.
- Ellenbecker, M., L. Sears, P. Li, J. M. Lanchy and J. S. Lodmell (2012). "Characterization of RNA aptamers directed against the nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus." *Antiviral Res* **93**(3): 330-339.
- Ellingham, M., D. H. Bunka, D. J. Rowlands and N. J. Stonehouse (2006). "Selection and characterization of RNA aptamers to the RNA-dependent RNA polymerase from foot-and-mouth disease virus." *Rna* **12**(11): 1970-1979.
- Ellington, A. D. and J. W. Szostak (1990). "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." *Nature* **346**(6287): 818-822.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ellington, A. D. and J. W. Szostak (1992). "Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures." *Nature* **355**(6363): 850-852.
- Eulberg, D. and S. Klussmann (2003). "Spiegelmers: biostable aptamers." *ChemBiochem* **4**(10): 979-983.
- Fajardo, T., Jr., M. F. Rosas, F. Sobrino and E. Martinez-Salas (2012). "Exploring IRES region accessibility by interference of foot-and-mouth disease virus infectivity." *PLoS ONE* **7**(7): e41382.
- Famulok, M. (1994). "Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder." *Journal of the American Chemical Society* **116**(5): 1698-1706.
- Fan, C., K. W. Plaxco and A. J. Heeger (2003). "Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9134-9137.
- Farina, A. K., Y. S. Bong, C. M. Feltes and S. W. Byers (2009). "Post-transcriptional regulation of cadherin-11 expression by GSK-3 and beta-catenin in prostate and breast cancer cells." *PLoS One* **4**(3): e4797.
- Fernandez-Miragall, O., S. Lopez de Quinto and E. Martinez-Salas (2009). "Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements." *Virus Res* **139**(2): 172-182.
- Fernandez-Miragall, O. and E. Martinez-Salas (2003). "Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif." *RNA* **9**(11): 1333-1344.
- Fernandez-Miragall, O., R. Ramos, J. Ramajo and E. Martinez-Salas (2006). "Evidence of reciprocal tertiary interactions between conserved motifs involved in organizing RNA structure essential for internal initiation of translation." *RNA* **12**(2): 223-234.
- Fernandez, N., O. Fernandez-Miragall, J. Ramajo, A. Garcia-Sacristan, N. Bellora, E. Eyraes, C. Briones and E. Martinez-Salas (2011). "Structural basis for the biological relevance of the invariant apical stem in IRES-mediated translation." *Nucleic Acids Res* **39**(19): 8572-8585.
- Ferris, J. P. (2006). "Montmorillonite-catalysed formation of RNA oligomers: the possible role of catalysis in the origins of life." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1474): 1777-1786; discussion 1786.
- Fitzgerald, K. D. and B. L. Semler (2009). "Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus." *Biochim Biophys Acta* **1789**(9-10): 518-528.
- Flather, D. and B. L. Semler (2015). "Picornaviruses and nuclear functions: targeting a cellular compartment distinct from the replication site of a positive-strand RNA virus." *Front Microbiol* **6**: 594.
- Fontana, W. and P. Schuster (1998). "Continuity in evolution: on the nature of transitions." *Science* **280**(5368): 1451-1455.
- Forrest, S., Z. Lear, M. R. Herod, M. Ryan, D. J. Rowlands and N. J. Stonehouse (2014). "Inhibition of the foot-and-mouth disease virus subgenomic replicon by RNA aptamers." *J Gen Virol* **95**(Pt 12): 2649-2657.
- Fox, G., N. R. Parry, P. V. Barnett, B. McGinn, D. J. Rowlands and F. Brown (1989). "The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid)." *J Gen Virol* **70** (Pt 3): 625-637.
- Fracastorius, H. (1546). "De sympathia et antipathia rerum liber unus. De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione liber I, Venice, Heirs of L. A. Junta."
- Fritz, J., D. Anselmetti, J. Jarchow and X. Fernandez-Busquets (1997). "Probing single biomolecules with atomic force microscopy." *J Struct Biol* **119**(2): 165-171.
- Fukuda, K., D. Vishinuvardhan, S. Sekiya, N. Kakiuchi, K. Shimotohno, P. K. Kumar and S. Nishikawa (1997). "Specific RNA aptamers to NS3 protease domain of hepatitis C virus." *Nucleic Acids Symp Ser* **37**: 237-238.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Gago, S., S. F. Elena, R. Flores and R. Sanjuan (2009). "Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid." *Science* **323**(5919): 1169-1202.
- García-Sacristán, A., M. Moreno, A. Ariza-Mateos, E. López-Camacho, R. M. Jáudenes, L. Vázquez, J. Gómez, J. Á. Martín-Gago and C. Briones (2014). "A magnesium-induced RNA conformational switch at the internal ribosome entry site of hepatitis C virus genome visualized by atomic force microscopy." *Nucleic Acids Research*.
- Geary, C., P. W. Rothmund and E. S. Andersen (2014). "RNA nanostructures. A single-stranded architecture for cotranscriptional folding of RNA nanostructures." *Science* **345**(6198): 799-804.
- Geiger, A., P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder and M. Famulok (1996). "RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity." *Nucleic Acids Res* **24**(6): 1029-1036.
- Gilbert, W. (1986). "Origin of life: The RNA world." *Nature* **319**(6055): 618-618.
- Gold, L., N. Janjic, T. Jarvis, D. Schneider, J. J. Walker, S. K. Wilcox and D. Zichi (2012). "Aptamers and the RNA world, past and present." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(3).
- Goodchild, J., S. Agrawal, M. P. Civeira, P. S. Sarin, D. Sun and P. C. Zamecnik (1988). "Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligodeoxynucleotides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(15): 5507-5511.
- Goodman, M. F., S. Keener, S. Guidotti and E. W. Branscomb (1983). "On the enzymatic basis for mutagenesis by manganese." *J Biol Chem* **258**(6): 3469-3475.
- Goringer, H. U., M. Homann and M. Lorger (2003). "In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules." *Int J Parasitol* **33**(12): 1309-1317.
- Griffin, L. C., G. F. Tidmarsh, L. C. Bock, J. J. Toole and L. L. Leung (1993). "In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits." *Blood* **81**(12): 3271-3276.
- Grundy, W. N., T. L. Bailey, C. P. Elkan and M. E. Baker (1997). "Meta-MEME: motif-based hidden Markov models of protein families." *Comput Appl Biosci* **13**(4): 397-406.
- Guatelli, J. C., K. M. Whitfield, D. Y. Kwok, K. J. Barringer, D. D. Richman and T. R. Gingeras (1990). "Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19): 7797.
- Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman (1983). "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." *Cell* **35**(3 Pt 2): 849-857.
- Haldane, J. B. S. (1929). "The origin of life." *Rationalist Annual*(148): 3-10.
- Hall, B., J. M. Micheletti, P. Satya, K. Ogle, J. Pollard and A. D. Ellington (2009). "Design, synthesis, and amplification of DNA pools for in vitro selection." *Curr Protoc Mol Biol* **24**(24).
- Hall, Z. W. and I. R. Lehman (1968). "An in vitro transversion by a mutationally altered T4-induced DNA polymerase." *J Mol Biol* **36**(3): 321-333.
- Hansma, H. G. and J. H. Hoh (1994). "Biomolecular imaging with the atomic force microscope." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**: 115-139.
- Harada, K. and A. D. Frankel (1995). "Identification of two novel arginine binding DNAs." *EMBO J* **14**(23): 5798-5811.
- Hayat, A. and J. L. Marty (2014). "Aptamer based electrochemical sensors for emerging environmental pollutants." *Frontiers in Chemistry* **2**: 41.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." *Genome Res* **6**(10): 986-994.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Hellen, C. U. and P. Sarnow (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules." *Genes Dev* **15**(13): 1593-1612.
- Henry, M. R., P. Wilkins Stevens, J. Sun and D. M. Kelso (1999). "Real-time measurements of DNA hybridization on microparticles with fluorescence resonance energy transfer." *Anal Biochem* **276**(2): 204-214.
- Hermann, T. and D. J. Patel (2000). "Adaptive recognition by nucleic acid aptamers." *Science* **287**(5454): 820-825.
- Hofacker, I. L., W. Fontana, P. F. Stadler, L. S. Bonhoeffer, M. Tacker and P. Schuster (1994). "Fast folding and comparison of RNA secondary structures." *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **125**(2): 167-188.
- Homann, M. and H. U. Goring (1999). "Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes." *Nucleic Acids Res* **27**(9): 2006-2014.
- Horcas, I., R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero and A. M. Baro (2007). "WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology." *Review of Scientific Instruments* **78**(1): 013705.
- Huxley, J. (1942). *Evolution: The Modern Synthesis*, John Wiley & Sons.
- Ikebukuro, K., C. Kiyohara and K. Sode (2005). "Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner." *Biosens Bioelectron* **20**(10): 2168-2172.
- Innis, M. A., D. H. Gelfand and J. J. Sninsky (1995). *PCR Strategies*, Elsevier Science.
- Ishikawa, M., D. Jin, Y. Sawada, S. Abe and T. Yoshitomi (2015). "Future therapies of wet age-related macular degeneration." *J Ophthalmol* **2015**: 138070.
- Jamal, S. M. and G. J. Belsham (2013). "Foot-and-mouth disease: past, present and future." *Vet Res* **44**: 116.
- Jang, S. K., H. G. Krausslich, M. J. Nicklin, G. M. Duke, A. C. Palmenberg and E. Wimmer (1988). "A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation." *J Virol* **62**(8): 2636-2643.
- Jenison, R. D., S. C. Gill, A. Pardi and B. Polisky (1994). "High-resolution molecular discrimination by RNA." *Science* **263**(5152): 1425-1429.
- Jensen, K. B., B. L. Atkinson, M. C. Willis, T. H. Koch and L. Gold (1995). "Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12220-12224.
- Jeong, S., S. R. Han, Y. J. Lee and S. W. Lee (2010). "Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen." *Biotechnol Lett* **32**(3): 379-385.
- Jing, M. and M. T. Bowser (2011a). "Isolation of DNA aptamers using micro free flow electrophoresis." *Lab Chip* **11**(21): 3703-3709.
- Jing, M. and M. T. Bowser (2011b). "Methods for measuring aptamer-protein equilibria: a review." *Anal Chim Acta* **686**(1-2): 9-18.
- Johnston, W. K., P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner and D. P. Bartel (2001). "RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension." *Science* **292**(5520): 1319-1325.
- Jorgenson, J. W. and K. D. Lukacs (1981). "Free-zone electrophoresis in glass capillaries." *Clin Chem* **27**(9): 1551-1553.
- Joyce, G. F. (1994). "In vitro evolution of nucleic acids." *Curr Opin Struct Biol* **4**: 331-336.
- Joyce, G. F. (2002). "The antiquity of RNA-based evolution." *Nature* **418**(6894): 214-221.
- Joyce, G. F. (2004). "Directed evolution of nucleic acid enzymes." *Annu Rev Biochem* **73**: 791-836.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Joyce, G. F. (2007). "Forty years of in vitro evolution." *Angew Chem Int Ed Engl* **46**(34): 6420-6436.
- Joyce, G. F. (2009). "Evolution in an RNA world." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **74**: 17-23.
- Kamiya, H., M. Ito and H. Harashima (2004). "Induction of transition and transversion mutations during random mutagenesis PCR by the addition of 2-hydroxy-dATP." *Biol Pharm Bull* **27**(5): 621-623.
- Kamiya, H., M. Ito and H. Harashima (2007). "Induction of various mutations during PCRs with manganese and 8-hydroxy-dGTP." *Biol Pharm Bull* **30**(4): 842-844.
- Kawakami, J., H. Imanaka, Y. Yokota and N. Sugimoto (2000). "In vitro selection of aptamers that act with Zn²⁺." *J Inorg Biochem* **82**(1-4): 197-206.
- Khan, M., K. Agarwal, M. Loutfi and A. Kamal (2014). "Present and Possible Therapies for Age-Related Macular Degeneration." *International Scholarly Research Notices* **2014**.
- Khati, M., M. Schuman, J. Ibrahim, Q. Sattentau, S. Gordon and W. James (2003). "Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'F-RNA aptamers." *J Virol* **77**(23): 12692-12698.
- Kikuchi, K., K. Fukuda, T. Umehara, J. Hwang, A. Kuno, T. Hasegawa and S. Nishikawa (2002). "In vitro selection of RNA aptamers that bind to domain II of HCV IRES." *Nucleic Acids Res Suppl*(2): 267-268.
- Kikuchi, K., T. Umehara, K. Fukuda, J. Hwang, A. Kuno, T. Hasegawa and S. Nishikawa (2003). "RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region." *J Biochem* **133**(3): 263-270.
- Kimura, M. (1985). The Neutral Theory of Molecular Evolution, Cambridge University Press.
- Klussmann, S. (2006). The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications, Wiley.
- Klussmann, S., A. Nolte, R. Bald, V. A. Erdmann and J. P. Furste (1996). "Mirror-image RNA that binds D-adenosine." *Nat Biotechnol* **14**(9): 1112-1115.
- Kong, H. Y. and J. Byun (2013). "Nucleic Acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science." *Biomol Ther (Seoul)* **21**(6): 423-434.
- Kowalinski, E., G. Bange, B. Bradatsch, E. Hurt, K. Wild and I. Sinning (2007). "The crystal structure of Ebp1 reveals a methionine aminopeptidase fold as binding platform for multiple interactions." *FEBS Lett* **581**(23): 4450-4454.
- Kruger, K., P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling and T. R. Cech (1982). "Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena." *Cell* **31**(1): 147-157.
- Kubik, M. F., C. Bell, T. Fitzwater, S. R. Watson and D. M. Tasset (1997). "Isolation and characterization of 2'-fluoro-, 2'-amino-, and 2'-fluoro-/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding." *J Immunol* **159**(1): 259-267.
- Kubik, M. F., A. W. Stephens, D. Schneider, R. A. Marlar and D. Tasset (1994). "High-affinity RNA ligands to human alpha-thrombin." *Nucleic Acids Res* **22**(13): 2619-2626.
- Kuipers, O. P. (1996). "Random mutagenesis by using mixtures of dNTP and dITP in PCR." *Methods Mol Biol* **57**: 351-356.
- Kulbachinskiy, A. V. (2007). "Methods for selection of aptamers to protein targets." *Biochemistry (Mosc)* **72**(13): 1505-1518.
- Kunkel, T. A. and L. A. Loeb (1979). "On the fidelity of DNA replication. Effect of divalent metal ion activators and deoxyrionucleoside triphosphate pools on in vitro mutagenesis." *J Biol Chem* **254**(13): 5718-5725.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Lakhin, A. V., V. Z. Tarantul and L. V. Gening (2013). "Aptamers: problems, solutions and prospects." *Acta Naturae* **5**(4): 34-43.
- Lamarck, J. B. (1809). *Philosophie zoologique*. Paris.
- Lamartine, J., et al. (1997). "Molecular cloning and mapping of a human cDNA (PA2G4) that encodes a protein highly homologous to the mouse cell cycle protein p38-2G4." *Cytogenet Cell Genet* **78**(1): 31-35.
- Lamont, E. A., L. He, K. Warriner, T. P. Labuza and S. Sreevatsan (2011). "A single DNA aptamer functions as a biosensor for ricin." *Analyst* **136**(19): 3884-3895.
- Landweber, L. F. (1999). "Experimental RNA evolution." *Trends Ecol Evol* **14**(9): 353-358.
- Lazcano, A. (2010). "Historical development of origins research." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(11): a002089.
- Lee, J. F., J. R. Hesselberth, L. A. Meyers and A. D. Ellington (2004). "Aptamer database." *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D95-100.
- Leontis, N. B., A. Lescoute and E. Westhof (2006). "The building blocks and motifs of RNA architecture." *Curr Opin Struct Biol* **16**(3): 279-287.
- Lessor, T. J. and A. W. Hamburger (2001). "Regulation of the ErbB3 binding protein Ebp1 by protein kinase C." *Mol Cell Endocrinol* **175**(1-2): 185-191.
- Leung, D. W., E. Chen and D. V. Goeddel (1989). "A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction." *Technique* **1**(1): 11-15.
- Lilley, D. M. (2005). "Structure, folding and mechanisms of ribozymes." *Curr Opin Struct Biol* **15**(3): 313-323.
- Lin-Goerke, J. L., D. J. Robbins and J. D. Burczak (1997). "PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration." *Biotechniques* **23**(3): 409-412.
- Liu, J. and Y. Lu (2005). "Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles." *Angew Chem Int Ed Engl* **45**(1): 90-94.
- Liu, Z., J. Y. Ahn, X. Liu and K. Ye (2006). "Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(29): 10917-10922.
- Loeffler, F. and P. Frosch (1897). "Summarischer bericht uber die ergebnisse der untersuchungen der kommoission zur erforschung der maul-und-klamenseuche, Zentralbl." *Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr.* **22**: 257-259.
- Longjam, N., R. Deb, A. K. Sarmah, T. Tayo, V. B. Awachat and V. K. Saxena (2011). "A Brief Review on Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease of Livestock: Conventional to Molecular Tools." *Vet Med Int* **2011**: 905768.
- Lopez de Quinto, S. and E. Martinez-Salas (1997). "Conserved structural motifs located in distal loops of aphthovirus internal ribosome entry site domain 3 are required for internal initiation of translation." *J Virol* **71**(5): 4171-4175.
- Lopez de Quinto, S. and E. Martinez-Salas (2000). "Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo." *RNA* **6**(10): 1380-1392.
- Lorenz, R., S. H. Bernhart, C. Honer Zu Siederdisen, H. Tafer, C. Flamm, P. F. Stadler and I. L. Hofacker (2011). "ViennaRNA Package 2.0." *Algorithms Mol Biol* **6**: 26.
- Lorsch, J. R. and J. W. Szostak (1994). "In vitro evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity." *Nature* **371**(6492): 31-36.
- Lou, X., et al. (2009). "Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 2989-2994.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Lozano, G., N. Fernandez and E. Martinez-Salas (2014). "Magnesium-dependent folding of a picornavirus IRES element modulates RNA conformation and eIF4G interaction." *FEBS J* **24**(10): 12890.
- Lozano, G., A. Trapote, J. Ramajo, X. Elduque, A. Grandas, J. Robles, E. Pedroso and E. Martinez-Salas (2015). "Local RNA flexibility perturbation of the IRES element induced by a novel ligand inhibits viral RNA translation." *RNA Biol* **12**(5): 555-568.
- Lyubchenko, Y., L. Shlyakhtenko, R. Harrington, P. Oden and S. Lindsay (1993). "Atomic force microscopy of long DNA: imaging in air and under water." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(6): 2137-2140.
- Lyubchenko, Y. L., A. A. Gall and L. S. Shlyakhtenko (2014). "Visualization of DNA and protein-DNA complexes with atomic force microscopy." *Methods Mol Biol* **1117**: 367-384.
- Ma, W. (2010). "The scenario on the origin of translation in the RNA world: in principle of replication parsimony." *Biol Direct* **5**: 65.
- Maglott, D., J. Ostell, K. D. Pruitt and T. Tatusova (2005). "Entrez Gene: gene-centered information at NCBI." *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D54-58.
- Mairal, T., V. C. Ozalp, P. Lozano Sanchez, M. Mir, I. Katakis and C. K. O'Sullivan (2008). "Aptamers: molecular tools for analytical applications." *Anal Bioanal Chem* **390**(4): 989-1007.
- Manrubia, S. C. and C. Briones (2007). "Modular evolution and increase of functional complexity in replicating RNA molecules." *RNA* **13**(1): 97-107.
- Manrubia, S. C. and J. A. Cuesta (2010). Neutral networks of genotypes: evolution behind the curtain.
- Marimuthu, C., T. H. Tang, J. Tominaga, S. C. Tan and S. C. B. Gopinath (2012). "Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation." *Analyst* **137**(6): 1307-1315.
- Marro, M. L., et al. (2005). "Identification of potent and selective RNA antagonists of the IFN-gamma-inducible CXCL10 chemokine." *Biochemistry* **44**(23): 8449-8460.
- Marshall, K. A. and A. D. Ellington (2000). "In vitro selection of RNA aptamers." *Methods Enzymol* **318**: 193-214.
- Martell, M., C. Briones, A. de Vicente, M. Piron, J. I. Esteban, R. Esteban, J. Guardia and J. Gomez (2004). "Structural analysis of hepatitis C RNA genome using DNA microarrays." *Nucleic Acids Res* **32**(11): e90.
- Martell, R. E., J. R. Nevins and B. A. Sullenger (2002). "Optimizing aptamer activity for gene therapy applications using expression cassette SELEX." *Mol Ther* **6**(1): 30-34.
- Martinez-Salas, E. (2008). "The impact of RNA structure on picornavirus IRES activity." *Trends Microbiol* **16**(5): 230-237.
- Martinez-Salas, E., R. Francisco-Velilla, J. Fernandez-Chamorro, G. Lozano and R. Diaz-Toledano (2015). "Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions." *Virus Res* **206**: 62-73.
- Mason, P. W., S. V. Bezborodova and T. M. Henry (2002). "Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus." *J Virol* **76**(19): 9686-9694.
- Mayer, G., M. Blind, W. Nagel, T. Bohm, T. Knorr, C. L. Jackson, W. Kolanus and M. Famulok (2001). "Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 4961-4965.
- McKeague, M. and M. C. Derosa (2012). "Challenges and opportunities for small molecule aptamer development." *J Nucleic Acids* **2012**: 748913.
- Mehta, J., B. Van Dorst, E. Rouah-Martin, W. Herrebout, M. L. Scippo, R. Blust and J. Robbins (2011). "In vitro selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol." *J Biotechnol* **155**(4): 361-369.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Mendonça, S. D. and M. T. Bowser (2004). "In Vitro Selection of High-Affinity DNA Ligands for Human IgE Using Capillary Electrophoresis." *Analytical Chemistry* **76**(18): 5387-5392.
- Miller, S. L. (1953). "A production of amino acids under possible primitive earth conditions." *Science* **117**(3046): 528-529.
- Mills, D. R., R. L. Peterson and S. Spiegelman (1967). "An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(1): 217-224.
- Mir, M., A. Jenkins, A. Toby and I. Katakis (2008). "Ultrasensitive detection based on an aptamer beacon electron transfer chain." *Electrochemistry Communications* **10**(10): 1533-1536.
- Miyachi, Y., N. Shimizu, C. Ogino, H. Fukuda and A. Kondo (2009). "Selection of a DNA aptamer that binds 8-OHdG using GMP-agarose." *Bioorg Med Chem Lett* **19**(13): 3619-3622.
- Miyachi, Y., N. Shimizu, C. Ogino, and A. Kondo (2010). "Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy". *Nucleic Acids Research*, **38**(4), e21.
- Mok, W. and Y. Li (2008). "Recent Progress in Nucleic Acid Aptamer-Based Biosensors and Bioassays." *Sensors* **8**(11): 7050-7084.
- Monie, T. P., et al. (2007). "Structural insights into the transcriptional and translational roles of Ebp1." *EMBO J* **26**(17): 3936-3944.
- Monnard, P. A., A. Kanavarioti and D. W. Deamer (2003). "Eutectic phase polymerization of activated ribonucleotide mixtures yields quasi-equi-molar incorporation of purine and pyrimidine nucleobases." *J Am Chem Soc* **125**(45): 13734-13740.
- Moore, M. D., B. I. Escudero-Abarca, S. H. Suh and L. A. Jaykus (2015). "Generation and characterization of nucleic acid aptamers targeting the capsid P domain of a human norovirus GII.4 strain." *J Biotechnol* **209**: 41-49.
- Moreno-Herrero, F., J. Colchero, J. Gomez-Herrero and A. M. Baro (2004). "Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **69**(3 Pt 1): 031915.
- Moreno, H., I. Gallego, N. Sevilla, J. C. de la Torre, E. Domingo and V. Martin (2011a). "Ribavirin can be mutagenic for arenaviruses." *J Virol* **85**(14): 7246-7255.
- Moreno, M. (2015). Aptasensor. *Encyclopedia of Astrobiology*. M. Gargaud, R. Amils, H. J. Cleaves, M. Viso and D. Pinti, Springer.
- Moreno, M., V. M. Gonzalez, E. Rincon, A. Domingo and E. Dominguez (2011b). "Aptasensor based on the selective electrodeposition of protein-linked gold nanoparticles on screen-printed electrodes." *Analyst* **136**(9): 1810-1815.
- Moreno, M., E. Rincon, D. Pineiro, G. Fernandez, A. Domingo, A. Jimenez-Ruiz, M. Salinas and V. Gonzalez (2003). "Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **308**(2): 214-218.
- Morris, K. N., K. B. Jensen, C. M. Julin, M. Weil and L. Gold (1998). "High affinity ligands from in vitro selection: complex targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 2902-2907.
- Mulhardt, C. (2010). *Molecular Biology and Genomics*, Elsevier Science.
- Müller, U. F. (2006). "Re-creating an RNA world." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **63**(11): 1278-1293.
- Murphy, M. B., S. T. Fuller, P. M. Richardson and S. A. Doyle (2003). "An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification." *Nucleic Acids Res* **31**(18).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Nahvi, A., N. Sudarsan, M. S. Ebert, X. Zou, K. L. Brown and R. R. Breaker (2002). "Genetic control by a metabolite binding mRNA." *Chem Biol* **9**(9).
- Nastasijevic, B., N. A. Becker, S. E. Wurster and L. J. Maher, 3rd (2008). "Sequence-specific binding of DNA and RNA to immobilized Nickel ions." *Biochem Biophys Res Commun* **366**(2): 420-425.
- Neff, S., D. Sa-Carvalho, E. Rieder, P. W. Mason, S. D. Blystone, E. J. Brown and B. Baxt (1998). "Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin $\alpha(v)\beta_3$ as its receptor." *J Virol* **72**(5): 3587-3594.
- Ng, E. W., D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, Jr., D. R. Guyer and A. P. Adamis (2006). "Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease." *Nat Rev Drug Discov* **5**(2): 123-132.
- Niazi, J. H., S. J. Lee and M. B. Gu (2008). "Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**(15): 7245-7253.
- Nicholas, K. B., H. B. Nicholas and D. W. Deerfield (1997). "{GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation}." *EMBNEW. NEWS* **4**: 14.
- Nielsen, P. E., M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt (1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide." *Science* **254**(5037): 1497-1500.
- Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz (2000). "The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis." *Science* **289**(5481): 920-930.
- Nitsche, A., et al. (2007). "One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX." *BMC Biotechnol* **7**: 48.
- Noma, T., K. Ikebukuro, K. Sode, T. Ohkubo, Y. Sakasegawa, N. Hachiya and K. Kaneko (2005). "Screening of DNA aptamers against multiple proteins in tissue." *Nucleic Acids Symp Ser* **49**: 357-358.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000). "Loop-mediated isothermal amplification of DNA." *Nucleic Acids Res* **28**(12).
- O'Sullivan, C. K. (2002). "Aptasensors--the future of biosensing?" *Anal Bioanal Chem* **372**(1): 44-48.
- Obika, S., D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida and T. Imanishi (1997). "Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar pucker." *Tetrahedron Lett* **38**(50): 8735-8738.
- Ohuchi, S. (2014). Identification of RNA Aptamers Against Recombinant Proteins with a Hexa-Histidine Tag. *Artificial Riboswitches*. A. Ogawa, Humana Press. **1111**: 41-56.
- Ohuchi, S. P., T. Ohtsu and Y. Nakamura (2006). "Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type III receptor displayed on cell surface." *Biochimie* **88**(7): 897-904.
- Olasagasti, F., H. J. Kim, N. Pourmand and D. W. Deamer (2011). "Non-enzymatic transfer of sequence information under plausible prebiotic conditions." *Biochimie* **93**(3): 556-561.
- Oparin, A. (1924). *Proiskhozhedenie Zhizni* Moscow, Mosckovskii Rabochii.
- Orgel, L. E. (1968). "Evolution of the genetic apparatus." *J Mol Biol* **38**(3): 381-393.
- Oró, J. (1960). "Synthesis of adenine from ammonium cyanide." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2**(6): 407-412.
- Ouellet, E., J. H. Foley, E. M. Conway and C Haynes (2015). "Hi-Fi SELEX: A high-fidelity digital-PCR based therapeutic aptamer discovery platform." *Biotechnology and bioengineering*, **112**(8), 1506-1522.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Pacheco, A. and E. Martinez-Salas (2010). "Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches." *J Biomed Biotechnol* **2010**: 458927.
- Pacheco, A., S. Reigadas and E. Martinez-Salas (2008). "Riboproteomic analysis of polypeptides interacting with the internal ribosome-entry site element of foot-and-mouth disease viral RNA." *Proteomics* **8**(22): 4782-4790.
- Pan, W. and G. A. Clawson (2010). "Primer-free aptamer selection using a random DNA library." *Methods Mol Biol* **629**: 369-385.
- Parida, M., G. Posadas, S. Inoue, F. Hasebe and K. Morita (2004). "Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus." *J Clin Microbiol* **42**(1): 257-263.
- Pasteur, L. (1864). Des générations spontanées.
- Patel, B. H., C. Percivalle, D. J. Ritson, C. D. Duffy and J. D. Sutherland (2015). "Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism." *Nat Chem* **7**(4): 301-307.
- Patel, D. J. (1997). "Structural analysis of nucleic acid aptamers." *Curr Opin Chem Biol* **1**(1): 32-46.
- Patel, D. J., A. K. Suri, F. Jiang, L. Jiang, P. Fan, R. A. Kumar and S. Nonin (1997). "Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes." *J Mol Biol* **272**(5): 645-664.
- Pavlov, A. R., N. V. Pavlova, S. A. Kozyavkin and A. I. Slesarev (2004). "Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications." *Trends Biotechnol* **22**(5): 253-260.
- Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." *Nature* **334**(6180): 320-325.
- Peng, L., B. J. Stephens, K. Bonin, R. Cubicciotti and M. Guthold (2007). "A combined atomic force/fluorescence microscopy technique to select aptamers in a single cycle from a small pool of random oligonucleotides." *Microsc Res Tech* **70**(4): 372-381.
- Pereira, H. G. (1981). Foot-and-mouth disease virus. Virus Diseases of Food Animals. R. P. G. e. Gibbs. New York, NY, Academic Press. **2**: 333-363.
- Pilipenko, E. V., T. V. Pestova, V. G. Kolupaeva, E. V. Khitrina, A. N. Poperechnaya, V. I. Agol and C. U. Hellen (2000). "A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor." *Genes Dev* **14**(16): 2028-2045.
- Pinto, A., M. C. Bermudo Redondo, V. C. Ozalp and C. K. O'Sullivan (2009). "Real-time apta-PCR for 20 000-fold improvement in detection limit." *Mol Biosyst* **5**(5): 548-553.
- Pinto, A., P. N. Polo, O. Henry, M. C. Redondo, M. Svobodova and C. K. O'Sullivan (2014). "Label-free detection of gliadin food allergen mediated by real-time apta-PCR." *Anal Bioanal Chem* **406**(2): 515-524.
- Pisarev, A. V., L. S. Chard, Y. Kaku, H. L. Johns, I. N. Shatsky and G. J. Belsham (2004). "Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus." *J Virol* **78**(9): 4487-4497.
- Polsky, R., R. Gill, L. Kaganovsky and I. Willner (2006). "Nucleic acid-functionalized Pt nanoparticles: Catalytic labels for the amplified electrochemical detection of biomolecules." *Anal Chem* **78**(7): 2268-2271.
- Powner, M. W., B. Gerland and J. D. Sutherland (2009). "Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions." *Nature* **459**(7244): 239-242.
- Poyry, T., L. Kinnunen and T. Hovi (1992). "Genetic variation in vivo and proposed functional domains of the 5' noncoding region of poliovirus RNA." *J Virol* **66**(9): 5313-5319.
- Pritchard, L., D. Corne, D. Kell, J. Rowland and M. Winson (2005). "A general model of error-prone PCR." *J Theor Biol* **234**(4): 497-509.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Puerta-Fernandez, E., C. Romero-Lopez, A. Barroso-delJesus and A. Berzal-Herranz (2003). "Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools." *FEMS Microbiol Rev* **27**(1): 75-97.
- Radi, A. E., J. L. Acero Sanchez, E. Baldrich and C. K. O'Sullivan (2006). "Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor." *J Am Chem Soc* **128**(1): 117-124.
- Radomski, N. and E. Jost (1995). "Molecular cloning of a murine cDNA encoding a novel protein, p38-2G4, which varies with the cell cycle." *Exp Cell Res* **220**(2): 434-445.
- Ramos, E., M. Moreno, M. E. Martin, M. Soto and V. M. Gonzalez (2010). "In Vitro Selection of Leishmania infantum H3-Binding ssDNA Aptamers." *Oligonucleotides* **20**(4): 207-213.
- Redi, F. (1668). Esperienze Intorno alla Generazione degl'Insetti.
- Reid, D. C., B. L. Chang, S. I. Gunderson, L. Alpert, W. A. Thompson and W. G. Fairbrother (2009). "Next-generation SELEX identifies sequence and structural determinants of splicing factor binding in human pre-mRNA sequence." *RNA* **15**(12): 2385-2397.
- Reiss, J., M. Krawczak, M. Schloesser, M. Wagner and D. N. Cooper (1990). "The effect of replication errors on the mismatch analysis of PCR-amplified DNA." *Nucleic Acids Res* **18**(4): 973-978.
- Rich, A. (1962). On the problems of evolution and biochemical information transfer. Horizons In Biochemistry. P. B. Kasha M. New York, Academic Press: 103-126.
- Riley, T. R., M. Slattery, N. Abe, C. Rastogi, D. Liu, R. S. Mann and H. J. Bussemaker (2014). "SELEX-seq: a method for characterizing the complete repertoire of binding site preferences for transcription factor complexes." *Methods Mol Biol* **1196**: 255-278.
- Roberts, R. W. and J. W. Szostak (1997). "RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12297-12302.
- Robertson, D. L. and G. F. Joyce (1990). "Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA." *Nature* **344**(6265): 467-468.
- Robertson, M. E., R. A. Seamons and G. J. Belsham (1999). "A selection system for functional internal ribosome entry site (IRES) elements: analysis of the requirement for a conserved GNRA tetraloop in the encephalomyocarditis virus IRES." *RNA* **5**(9): 1167-1179.
- Robertson, M. P. and G. F. Joyce (2012). "The origins of the RNA world." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(5).
- Robertson, M. P., S. M. Knudsen and A. D. Ellington (2004). "In vitro selection of ribozymes dependent on peptides for activity." *RNA* **10**(1): 114-127.
- Romero-Lopez, C., R. Diaz-Gonzalez, A. Barroso-del Jesus and A. Berzal-Herranz (2009). "Inhibition of hepatitis C virus replication and internal ribosome entry site-dependent translation by an RNA molecule." *J Gen Virol* **90**(Pt 7): 1659-1669.
- Rosenberg, J., et al. (2014). "A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma." *Invest New Drugs* **32**(1): 178-187.
- Roulet, E., S. Busso, A. A. Camargo, A. J. Simpson, N. Mermoud and P. Bucher (2002). "High-throughput SELEX SAGE method for quantitative modeling of transcription-factor binding sites." *Nat Biotechnol* **20**(8): 831-835.
- Ruckman, J., L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh and N. Janjic (1998). "2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain." *J Biol Chem* **273**(32): 20556-20567.
- Ruiz-Mirazo, K., C. Briones and A. de la Escosura (2014). "Prebiotic systems chemistry: new perspectives for the origins of life." *Chem Rev* **114**(1): 285-366.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Russo Krauss, I., A. Merlino, A. Randazzo, E. Novellino, L. Mazzarella and F. Sica (2012). "High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity." *Nucleic Acids Res* **40**(16): 8119-8128.
- Sanchez-Luque, F. J., M. Stich, S. Manrubia, C. Briones and A. Berzal-Herranz (2014). "Efficient HIV-1 inhibition by a 16 nt-long RNA aptamer designed by combining in vitro selection and in silico optimisation strategies." *Sci Rep* **4**(6242).
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sassanfar, M. and J. W. Szostak (1993). "An RNA motif that binds ATP." *Nature* **364**(6437): 550-553.
- Savory, N., K. Abe, K. Sode and K. Ikebukuro (2010). "Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing." *Biosens Bioelectron* **26**(4): 1386-1391.
- Sayer, N., J. Ibrahim, K. Turner, A. Tahiri-Alaoui and W. James (2002). "Structural characterization of a 2'F-RNA aptamer that binds a HIV-1 SU glycoprotein, gp120." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(3): 924-931.
- Schmitt, T. and N. Lehman (1999). "Non-unity molecular heritability demonstrated by continuous evolution in vitro." *Chem Biol* **6**(12): 857-869.
- Schneider, K. C. and S. A. Benner (1990). "Oligonucleotides containing flexible nucleoside analogs." *Journal of the American Chemical Society* **112**(1): 453-455.
- Schoning, K., P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy and A. Eschenmoser (2000). "Chemical etiology of nucleic acid structure: the alpha-threofuranosyl-(3'-->2') oligonucleotide system." *Science* **290**(5495): 1347-1351.
- Schopf, J. W. (1993). "Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life." *Science* **260**: 640-646.
- Schuster, P. (1997a). "Genotypes with phenotypes: adventures in an RNA toy world." *Biophys Chem* **66**(2-3): 75-110.
- Schuster, P. (1997b). "Landscapes and molecular evolution." *Physica D: Nonlinear Phenomena* **107**(2-4): 351-365.
- Schuster, P., W. Fontana, P. F. Stadler and I. L. Hofacker (1994). "From sequences to shapes and back: a case study in RNA secondary structures." *Proc Biol Sci* **255**(1344): 279-284.
- Sellers, R. F. (1971). "Quantitative aspects of the spread of foot-and-mouth disease." *Vet. Bull.*(41): 431-439.
- Serrano, P., J. Ramajo and E. Martinez-Salas (2009). "Rescue of internal initiation of translation by RNA complementation provides evidence for a distribution of functions between individual IRES domains." *Virology* **388**(1): 221-229.
- Shangguan, D., Z. Cao, L. Meng, P. Mallikaratchy, K. Sefah, H. Wang, Y. Li and W. Tan (2008). "Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells." *J Proteome Res* **7**(5): 2133-2139.
- Shiratori, I., J. Akitomi, D. A. Boltz, K. Horii, M. Furuichi and I. Waga (2014). "Selection of DNA aptamers that bind to influenza A viruses with high affinity and broad subtype specificity." *Biochem Biophys Res Commun* **443**(1): 37-41.
- Sirover, M. A. and L. A. Loeb (1976). "Metal-induced infidelity during DNA synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2331-2335.
- Sirover, M. A. and L. A. Loeb (1977). "On the fidelity of DNA replication. Effect of metal activators during synthesis with avian myeloblastosis virus DNA polymerase." *J Biol Chem* **252**(11): 3605-3610.
- Smith, D., G. P. Kirschenheuter, J. Charlton, D. M. Guidot and J. E. Repine (1995). "In vitro selection of RNA-based irreversible inhibitors of human neutrophil elastase." *Chem Biol* **2**(11): 741-750.
- Smith, J. D. and L. Gold (2004). Conditional-selex, Google Patents.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Sobrinho, F., M. Saiz, M. A. Jimenez-Clavero, J. I. Nunez, M. F. Rosas, E. Baranowski and V. Ley (2001). "Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat." *Vet Res* **32**(1): 1-30.
- Song, K.-M., S. Lee and C. Ban (2012). "Aptamers and Their Biological Applications." *Sensors* **12**(1): 612-631.
- Spee, J. H., W. M. de Vos and O. P. Kuipers (1993). "Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP." *Nucleic Acids Res* **21**(3): 777-778.
- Spirin, A. S. (2002). "Omnipotent RNA." *FEBS Lett* **530**(1-3): 4-8.
- Squatrito, M., M. Mancino, M. Donzelli, L. B. Areces and G. F. Draetta (2004). "EBP1 is a nucleolar growth-regulating protein that is part of pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes." *Oncogene* **23**(25): 4454-4465.
- Squatrito, M., M. Mancino, L. Sala and G. F. Draetta (2006). "Ebp1 is a dsRNA-binding protein associated with ribosomes that modulates eIF2alpha phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* **344**(3): 859-868.
- Stein, C. A., C. Subasinghe, K. Shinozuka and J. S. Cohen (1988). "Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides." *Nucleic Acids Res* **16**(8): 3209-3221.
- Stemmer, W. P. (1994). "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." *Nature* **370**(6488): 389-391.
- Sterba, K. M., S. G. Mackintosh, J. S. Blevins, B. K. Hurlburt and M. S. Smeltzer (2003). "Characterization of Staphylococcus aureus SarA binding sites." *J Bacteriol* **185**(15): 4410-4417.
- Stich, M., C. Briones and S. C. Manrubia (2008). "On the structural repertoire of pools of short, random RNA sequences." *J Theor Biol* **252**(4): 750-763.
- Stoltenburg, R., C. Reinemann and B. Strehlitz (2005). "FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection." *Anal Bioanal Chem* **383**(1): 83-91.
- Stoltenburg, R., C. Reinemann and B. Strehlitz (2007). "SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands." *Biomol Eng* **24**(4): 381-403.
- Stoltenburg, R., N. Nikolaus and B. Strehlitz (2012). "Capture-SELEX: selection of DNA aptamers for aminoglycoside antibiotics." *Journal of analytical methods in chemistry*, 2012.
- Stoneley, M. and A. E. Willis (2004). "Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression." *Oncogene* **23**(18): 3200-3207.
- Sun, H. and Y. Zu (2015). "A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application." *Molecules* **20**(7): 11959-11980.
- Sundaram, P., H. Kurniawan, M. E. Byrne and J. Wower (2013). "Therapeutic RNA aptamers in clinical trials." *Eur J Pharm Sci* **48**(1-2): 259-271.
- Svobodova, M., A. Pinto, P. Nadal and C. K. O' Sullivan (2012). "Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**(3): 835-842.
- Syrett, H. A., J. Collett and A. Ellington (2009). Aptamer Microarrays. Functional Nucleic Acids for Sensing and Other Analytical Applications. New York, NY, Springer 287-308.
- Szeto, K., D. R. Latulippe, A. Ozer, J. M. Pagano, B. S. White, D. Shalloway, J. T. Lis and H. G. Craighead (2013). "RAPID-SELEX for RNA aptamers." *PLoS One* **8**(12): e82667.
- Tanaka, Y., T. Honda, K. Matsuura, Y. Kimura and M. Inui (2009). "In vitro selection and characterization of DNA aptamers specific for phospholamban." *J Pharmacol Exp Ther* **329**(1): 57-63.
- Tavitian, B. and U. Haberkorn (2009). "Darwinian molecular imaging." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **36**(9): 1475-1482.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Taylor, A. I., V. B. Pinheiro, M. J. Smola, A. S. Morgunov, S. Peak-Chew, C. Cozens, K. M. Weeks, P. Herdewijn and P. Holliger (2015). "Catalysts from synthetic genetic polymers." *Nature* **518**(7539): 427-430.
- Temin, H. M. and S. Mizutani (1970). "Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus." *Nature* **226**(5252): 1211-1213.
- Theis, M. G., A. Knorre, B. Kellersch, J. Moellenken, F. Wieland, W. Kolanus and M. Famulok (2004). "Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(31): 11221-11226.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res* **22**(22): 4673-4680.
- Torres-Chavolla, E. and E. C. Alocilja (2009). "Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens." *Biosens Bioelectron* **24**(11): 3175-3182.
- Tsai, R. Y. and R. R. Reed (1998). "Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz." *Mol Cell Biol* **18**(11): 6447-6456.
- Tsuji, S., T. Tanaka, N. Hirabayashi, S. Kato, J. Akitomi, H. Egashira, I. Waga and T. Ohtsu (2009). "RNA aptamer binding to polyhistidine-tag." *Biochem Biophys Res Commun* **386**(1): 227-231.
- Tucker, B. J. and R. R. Breaker (2005). "Riboswitches as versatile gene control elements." *Curr Opin Struct Biol* **15**(3): 342-348.
- Tuerk, C. and L. Gold (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science* **249**(4968): 505-510.
- Tyagi, S. and F. R. Kramer (1996). "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization." *Nat Biotechnol* **14**(3): 303-308.
- Vallée, H. C., H. (1922). "Sur la pluralité du virus aphteux." *C R Hebd Acad Sci Paris*(174): 1498-1500.
- Vater, A., F. Jarosch, K. Buchner and S. Klussmann (2003). "Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX." *Nucleic Acids Res* **31**(21).
- Vicens, M. C., A. Sen, A. Vanderlaan, T. J. Drake and W. Tan (2005). "Investigation of molecular beacon aptamer-based bioassay for platelet-derived growth factor detection." *Chembiochem* **6**(5): 900-907.
- Vivekananda, J. and J. L. Kiel (2006). "Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay." *Lab Invest* **86**(6): 610-618.
- Vuyisich, M. and P. A. Beal (2002). "Controlling protein activity with ligand-regulated RNA aptamers." *Chemistry & Biology* **9**(8): 907-913.
- Waldmann, O. T., K. (1926). "Experimentelle untersuchungen ueber die pluralitet des maul-und klauenseuche virus. Berlin Tierarztl Wochenschr." (44): 569-571.
- Walsh, R. and M. C. DeRosa (2009). "Retention of function in the DNA homolog of the RNA dopamine aptamer." *Biochem Biophys Res Commun* **388**(4): 732-735.
- Wandtke, T., J. Wozniak and P. Kopinski (2015). "Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections." *Viruses* **7**(2): 751-780.
- Wang, J., H. Jiang and F. Liu (2000). "In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegalovirus and block viral infection." *RNA* **6**(4): 571-583.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Wang, J. and G. Li (2011). "Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application." *Curr Med Chem* **18**(27): 4107-4116.
- Watrin, M., F. Von Pelchrzim, E. Dausse, R. Schroeder and J. J. Toulme (2009). "In vitro selection of RNA aptamers derived from a genomic human library against the TAR RNA element of HIV-1." *Biochemistry* **48**(26): 6278-6284.
- Weiss, S., D. Proske, M. Neumann, M. H. Groschup, H. A. Kretzschmar, M. Famulok and E. L. Winnacker (1997). "RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP." *J Virol* **71**(11): 8790-8797.
- Weymouth, L. A. and L. A. Loeb (1978). "Mutagenesis during in vitro DNA synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(4): 1924-1928.
- White, R., C. Rusconi, E. Scardino, A. Wolberg, J. Lawson, M. Hoffman and B. Sullenger (2001). "Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX." *Mol Ther* **4**(6): 567-573.
- Whited, A. M. and P. S. Park (2014). "Atomic force microscopy: a multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands." *Biochim Biophys Acta* **1838**(1 Pt A): 56-68.
- Wilson, C. and J. W. Szostak (1998). "Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity." *Chem Biol* **5**(11): 609-617.
- Wilson, D. S. and J. W. Szostak (1999). "In vitro selection of functional nucleic acids." *Annu Rev Biochem* **68**: 611-647.
- Williams, K. P. and D. P. Bartel (1995). "PCR product with strands of unequal length." *Nucleic Acids Res* **23**(20): 4220-4221.
- Winkler, W., A. Nahvi and R. R. Breaker (2002). "Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression." *Nature* **419**(6910): 952-956.
- Wochner, A., J. Attwater, A. Coulson and P. Holliger (2011). "Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme." *Science* **332**(6026): 209-212.
- Woese, C. and G. Fox (1977). "The concept of cellular evolution." *Journal of Molecular Evolution* **10**(1): 1-6.
- Woese, C. R. (1967). The Genetic Code: the molecular basis for gene expression. New York, Harper and Row.
- Wright, M. C. and G. F. Joyce (1997). "Continuous in vitro evolution of catalytic function." *Science* **276**(5312): 614-617.
- Wu, L. and J. F. Curran (1999). "An allosteric synthetic DNA." *Nucleic Acids Res* **27**(6): 1512-1516.
- Xi, Z., R. Huang, Y. Deng and N. He (2014). "Progress in selection and biomedical applications of aptamers." *J Biomed Nanotechnol* **10**(10): 3043-3062.
- Yang, Y., D. Yang, H. J. Schluesener and Z. Zhang (2007). "Advances in SELEX and application of aptamers in the central nervous system." *Biomol Eng* **24**(6): 583-592.
- Yoo, J. Y., X. W. Wang, A. K. Rishi, T. Lessor, X. M. Xia, T. A. Gustafson and A. W. Hamburger (2000). "Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB-3 and regulation of this binding by heregulin." *Br J Cancer* **82**(3): 683-690.
- Yoshida, W., E. Mochizuki, M. Takase, H. Hasegawa, Y. Morita, H. Yamazaki, K. Sode and K. Ikebukuro (2009). "Selection of DNA aptamers against insulin and construction of an aptameric enzyme subunit for insulin sensing." *Biosens Bioelectron* **24**(5): 1116-1120.
- Yu, H., J. Li, D. Zhang, Y. Yang, W. Jiang and S. Yang (2009). "Improving the thermostability of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase by error-prone PCR." *Appl Microbiol Biotechnol* **82**(2): 279-285.
- Yu, H., S. Zhang and J. C. Chaput (2012). "Darwinian evolution of an alternative genetic system provides support for TNA as an RNA progenitor." *Nat Chem* **4**(3): 183-187.

7. BIBLIOGRAFÍA

Yu, Y., I. S. Abaeva, A. Marintchev, T. V. Pestova and C. U. Hellen (2011). "Common conformational changes induced in type 2 picornavirus IRESs by cognate trans-acting factors." *Nucleic Acids Res* **39**(11): 4851-4865.

Zhang, Y. and A. W. Hamburger (2004). "Heregulin regulates the ability of the ErbB3-binding protein Ebp1 to bind E2F promoter elements and repress E2F-mediated transcription." *J Biol Chem* **279**(25): 26126-26133.

Zhang, Y., Y. Lu, H. Zhou, M. Lee, Z. Liu, B. A. Hassel and A. W. Hamburger (2008). "Alterations in cell growth and signaling in ErbB3 binding protein-1 (Ebp1) deficient mice." *BMC Cell Biol* **9**: 69.

Zhong, T., Y. Zhou, L. Bi and X. E. Zhang (2011). "MutS-mediated enrichment of mutated DNA produced by directed evolution in vitro." *World J Microbiol Biotechnol* **27**(6): 1367-1372.

Zhou, J. and J. J. Rossi (2014). "Cell-type-specific, Aptamer-functionalized Agents for Targeted Disease Therapy." *Mol Ther Nucleic Acids* **17**(3): 21.

Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." *Nucleic Acids Research* **31**(13): 3406-3415.

8. APÉNDICES

8.1. APÉNDICE I

Tabla A1. Principales DNA polimerasas disponibles comercialmente con su origen, proveedor y tasa de error media indicada por el fabricante.

ENZIMA	ORIGEN	TASA DE MUTACIÓN*	PROVEEDOR
Phusion High-Fidelity DNA polymerase	La polimerasa incluye un dominio de unión a DNA fusionado a una polimerasa con actividad correctora de errores semejante a la de <i>Pyrococcus</i>	$4,4 \times 10^{-7}$	Thermo Scientific
Pwo DNA Polymerase	<i>Pyrococcus woesei</i>	$7,22 \times 10^{-7}$	Roche
Pfx50 DNA Polymerase	Fusión de una DNA pol de <i>Thermococcus zilligii</i> con una proteína accesoria	$8,34 \times 10^{-7}$	Life Technologies
PfuTurbo Cx Hotstart DNA Pol	Mutante de <i>Pfu</i> (<i>Pyrococcus furiosus</i>)	$1,3 \times 10^{-6}$	Agilent
Platinum Pfx	Variante recombinante de <i>Taq</i> DNA pol acomplexada con un anticuerpo que inhibe la actividad de la polimerasa a temperatura ambiente	$1,58 \times 10^{-6}$	Life Technologies
AccuPrim Pfx	<i>Thermococcus species</i> strain KOD	$1,58 \times 10^{-6}$	Life Technologies
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	$1,6 \times 10^{-6}$	Promega
Pfu DNA polymerase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	$2,8 \times 10^{-6}$	Thermo Scientific
Herculase DNA pol	Combinación de: <i>Pfu</i> , <i>Taq</i> y <i>ArchaeMaxx</i> (factor potenciador de la polimerasa)	$2,8 \times 10^{-6}$	Agilent
FastStart High Fidelity PCR System	Mezcla de <i>FastStart Taq</i> DNA pol y una proteína correctora de errores termoestable sin actividad polimerasa	$3,2 \times 10^{-6}$	Roche
Expand High Fidelity PCR System**	<i>Taq</i> DNA pol y <i>Tgo</i> pol con actividad correctora de errores	$4,33 \times 10^{-6}$	Roche
AccuPrim Taq HiFi	Mezcla de <i>Taq</i> recombinante, polimerasa de <i>Pyrococcus species</i> GB-D y anticuerpo <i>Platinum Taq</i>	$4,63 \times 10^{-6}$	Life Technologies
Platinum Taq HiFi	Mezcla de <i>Platinum Taq</i> y la actividad correctora de errores de una polimerasa de <i>Pyrococcus</i>	$6,8 \times 10^{-6}$	Life Technologies
Long PCR Enzyme Mix	Mezcla de <i>Taq</i> DNA pol y una DNA polimerasa termoestable de alta fidelidad con actividad correctora de errores	$7,6 \times 10^{-6}$	Thermo Scientific
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	$1,3 \times 10^{-5}$	Roche
FastStart Taq DNA Polymerase	<i>Taq</i> DNA polimerasa recombinante	$1,3 \times 10^{-5}$	Roche

8. APÉNDICES

AccuPrime Taq	<i>Taq</i> DNA pol y enzima correctora de errores	2×10^{-5}	Life Technologies
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	$2,28 \times 10^{-5}$	Thermo Scientific
Tfi	<i>Thermus filiformis</i>	$4,1 \times 10^{-5}$	Life Technologies
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	$4,1 \times 10^{-5}$	Life Technologies
Platinum Taq	<i>Taq</i> DNA pol recombinante	$4,1 \times 10^{-5}$	Life Technologies
AmpliTaq	<i>Taq</i> DNA pol recombinante	$4,17 \times 10^{-5}$	Life Technologies
Vent_R/Deep Vent_R	<i>Thermococcus litoralis</i> / <i>Pyrococcus sp.</i>	$<4,6 \times 10^{-5} - 5,6 \times 10^{-5}$	New England Biolabs
OneTaq	Mezcla de las polimerasas <i>Taq</i> y <i>Deep Vent</i>	$<1,4 \times 10^{-4}$	New England Biolabs
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	$<2,8 \times 10^{-4}$	New England Biolabs
EpiMark Hot Start Taq	Mezcla de <i>Taq</i> y un inhibidor sensible a temperatura	$<2,8 \times 10^{-4}$	New England Biolabs
Mutazyme II	Mezcla de <i>Taq</i> mutante y <i>Mutazyme I</i> DNA polimerasa.	$1 \times 10^{-3} - 1,6 \times 10^{-2}$	Agilent Technologies

*Tasa de mutación por nucleótido copiado y ciclo de amplificación.

** Utilizada en este trabajo.

8.2. APÉNDICE II

Tabla A1. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular del control positivo de PCR con la molécula molde R5-26 (condiciones de alta fidelidad). La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a las dos regiones constantes necesarias par la unión de los cebadores. Se comprobó la fidelidad de la enzima en las condiciones de PCR empleadas, ya que ninguna de las secuencias analizadas mostró mutaciones respecto a la secuencia control (indicada como R5-26).

Nombre	Secuencia 5'-3'
C+R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
C+R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Tabla A2. Alineamiento por ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular del control positivo de PCR con la molécula molde NS2 (condiciones de alta fidelidad). La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. Se comprobó la fidelidad de la enzima en las condiciones de PCR empleadas, ya que ninguna de las secuencias analizadas mostró mutación alguna respecto a la secuencia control (indicada como NS2). La columna “Nt” hace referencia a la posición del último nucleótido analizado en cada bloque del alineamiento.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
C+NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
C+NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
C+NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
C+NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

8. APÉNDICES

C+NS2-06	TTCCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
C+NS2-07	TTCCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
C+NS2-08	TTCCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
C+NS2-09	TTCCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
C+NS2-10	TTCCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-08	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-09	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
C+NS2-10	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-03	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-04	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-06	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-07	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-08	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-09	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
C+NS2-10	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
C+NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

8. APÉNDICES

C+NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
C+NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
C+NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
C+NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
C+NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
C+NS2-08	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
C+NS2-09	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
C+NS2-10	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-07	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-08	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-09	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
C+NS2-10	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-02	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-03	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-04	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-05	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-06	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-07	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-08	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-09	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
C+NS2-10	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-06	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-08	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-09	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
C+NS2-10	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
C+NS2-10	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
C+NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
C+NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
C+NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
C+NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
C+NS2-06	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
C+NS2-07	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
C+NS2-08	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
C+NS2-09	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

8. APÉNDICES

C+NS2-10	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-06	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-07	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-08	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-09	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
C+NS2-10	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
C+NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
C+NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559

8. APÉNDICES

Tabla A3. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs mutagénicas con A y T disminuidos respecto a G y C en la mezcla de reacción, utilizando R5-26 como DNA molde. La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. El prefijo 40D, 50D, 60D y 70D de los nombres de las secuencias hace referencia al porcentaje de A y T reducido respecto a G y C. En la columna “Secuencia 5’-3’” se indican en rojo las posiciones que han sufrido alguna mutación.

Nombre	Secuencia 5’-3’
40D-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40D-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5’-3’
50D-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50D-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

8. APÉNDICES

50D-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
60D-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60D-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
70D-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGTAGTG
70D-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70D-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

8. APÉNDICES

Tabla A4. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs mutagénicas con A y T disminuidos respecto a G y C en la mezcla de reacción, con NS2 como DNA molde. La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. El prefijo 30D, 50D y 70D de los nombres de las secuencias hace referencia al porcentaje de A y T reducido respecto a G y C. En la columna “Secuencia 5’-3’” se indican en rojo las posiciones que han sufrido alguna mutación. La columna “Nt” hace referencia a la posición del último nucleótido analizado en cada bloque del alineamiento.

Nombre	Secuencia 5’-3’	Nt
30D-NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-06	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-07	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-08	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-09	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
30D-NS2-10	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5’-3’	Nt
30D-NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-08	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-09	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30D-NS2-10	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

Nombre	Secuencia 5’-3’	Nt
30D-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30D-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30D-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30D-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30D-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30D-NS2-06	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153

8. APÉNDICES

30D-NS2-07	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
30D-NS2-08	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
30D-NS2-09	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
30D-NS2-10	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30D-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-08	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-09	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30D-NS2-10	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30D-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-07	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-08	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-09	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30D-NS2-10	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30D-NS2-01	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
30D-NS2-02	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
30D-NS2-03	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
30D-NS2-04	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
30D-NS2-05	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
30D-NS2-06	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
30D-NS2-07	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
30D-NS2-08	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
30D-NS2-09	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306

8. APÉNDICES

30D-NS2-10	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30D-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-06	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-08	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-09	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
30D-NS2-10	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30D-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30D-NS2-10	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30D-NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-06	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-07	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-08	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-09	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{TGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30D-NS2-10	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAA ^{CGT} CCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30D-NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-06	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-07	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-08	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-09	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
30D-NS2-10	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30D-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
30D-NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-06	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-07	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-08	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-09	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50D-NS2-10	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-08	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-09	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50D-NS2-10	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-06	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-07	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-08	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-09	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
50D-NS2-10	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-08	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-09	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50D-NS2-10	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-07	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-08	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-09	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50D-NS2-10	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-02	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-03	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-04	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-05	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-06	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-07	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-08	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-09	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
50D-NS2-10	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-06	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-08	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-09	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
50D-NS2-10	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
50D-NS2-10	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-06	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-07	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-08	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-09	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50D-NS2-10	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-06	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-07	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-08	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-09	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50D-NS2-10	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50D-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
50D-NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
70D-NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
70D-NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
70D-NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
70D-NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
70D-NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
70D-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
70D-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
70D-NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
70D-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
70D-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
70D-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
70D-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
70D-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
70D-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
70D-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
70D-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
70D-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
70D-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
70D-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
70D-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
70D-NS2-02	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
70D-NS2-03	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
70D-NS2-04	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
70D-NS2-05	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
70D-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
70D-NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
70D-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
70D-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCA	408
70D-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCA	408
70D-NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCA	408
70D-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCA	408
70D-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCA	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCA	408

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
70D-NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
70D-NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
70D-NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
70D-NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
70D-NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
70D-NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
70D-NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
70D-NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
70D-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
70D-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
70D-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
70D-NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
70D-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559

Tabla A5. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs mutagénicas con A y T aumentados respecto a G y C en la mezcla de reacción, con R5-26 como DNA molde. La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. El prefijo 70A, 60A, 50A y 30A de los nombres de las secuencias hace referencia al porcentaje de A y T aumentado respecto a G y C.

Nombre	Secuencia 5'-3'
70A-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTTGCGCTTGGCAGTG
70A -R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTTGCGCTTGGCAGTG
70A -R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTTGCGCTTGGCAGTG
70A -R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTTGCGCTTGGCAGTG

8. APÉNDICES

70A -R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70A-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70A-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70A-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70A-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70A-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70A-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
70A-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
60A-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A -R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A -R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A -R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A -R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
60A-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
50A-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A -R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A -R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A -R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A -R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50A-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'
30A-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A -R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A -R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A -R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A -R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30A-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Tabla A6. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs mutagénicas con A y T aumentados respecto a G y C en la mezcla de reacción, con NS2 como DNA molde. La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. El prefijo 60A, 50A y 30A de los nombres de las secuencias hace referencia al porcentaje de A y T aumentado respecto a G y C. En la columna “Secuencia 5'-3'” se indican en rojo las posiciones que han sufrido alguna mutación. La columna “Nt” hace referencia a la posición del último nucleótido analizado en cada bloque del alineamiento.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-06	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-07	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-08	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-09	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
60A-NS2-10	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-08	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-09	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
60A-NS2-10	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-06	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-07	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-08	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-09	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
60A-NS2-10	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-08	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-09	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
60A-NS2-10	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-07	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-08	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-09	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
60A-NS2-10	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-02	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-03	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-04	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-05	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-06	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-07	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-08	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-09	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
60A-NS2-10	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-06	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-08	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-09	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
60A-NS2-10	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
60A-NS2-10	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCCAT	408

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-06	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-07	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-08	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-09	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
60A-NS2-10	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-06	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-07	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-08	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-09	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
60A-NS2-10	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
60A-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
60A-NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-06	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-07	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-08	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-09	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
50A-NS2-10	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-08	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-09	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
50A-NS2-10	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-06	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-07	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-08	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-09	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
50A-NS2-10	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-08	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-09	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
50A-NS2-10	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-07	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-08	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-09	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
50A-NS2-10	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-02	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-03	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-04	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-05	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-06	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-07	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-08	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-09	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
50A-NS2-10	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-06	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-08	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-09	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
50A-NS2-10	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
50A-NS2-10	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-06	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-07	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-08	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-09	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
50A-NS2-10	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-06	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-07	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-08	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-09	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
50A-NS2-10	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
50A-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
50A-NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGA C GATGCTG	51
30A-NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGA T GATGCTG	51
30A-NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGA T GATGCTG	51
30A-NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGA T GATGCTG	51
30A-NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGA T GATGCTG	51
30A-NS2-06	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGA T GATGCTG	51
30A-NS2-07	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGA T GATGCTG	51
NS2	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGA T GATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30A-NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30A-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30A-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30A-NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30A-NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
30A-NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30A-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30A-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30A-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30A-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30A-NS2-06	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
30A-NS2-07	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30A-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30A-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30A-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30A-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30A-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
30A-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30A-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30A-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30A-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30A-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30A-NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
30A-NS2-07	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
30A-NS2-02	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
30A-NS2-03	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
30A-NS2-04	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
30A-NS2-05	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
30A-NS2-06	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
30A-NS2-07	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
30A-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
30A-NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
30A-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
30A-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
30A-NS2-06	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
30A-NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30A-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30A-NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30A-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30A-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30A-NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
30A-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGTCAT	408

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30A-NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30A-NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30A-NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30A-NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30A-NS2-06	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
30A-NS2-07	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
30A-NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
30A-NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
30A-NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
30A-NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
30A-NS2-06	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
30A-NS2-07	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
30A-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
30A-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
30A-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
30A-NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
30A-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
30A-NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
30A-NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559

8. APÉNDICES

Tabla A7. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs mutagénicas, con incremento de $MgCl_2$ en la mezcla de reacción con R5-26 como DNA molde. La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. El prefijo 10, 20, 25, 30, 35, 40 y 50 de los nombres de las secuencias hace referencia a la concentración mM final de $MgCl_2$ en la PCR. En la columna “Secuencia 5’-3’” se indican en rojo las posiciones con mutación.

Nombre	Secuencia 5’-3’
10Mg-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
10Mg-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5’-3’
20Mg-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
20Mg-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'
25Mg-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
25Mg-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
30Mg-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
30Mg-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
35Mg-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

8. APÉNDICES

35Mg-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
35Mg-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
40Mg-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
40Mg-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
50Mg-R526-01	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-02	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-03	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-04	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-05	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-06	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-07	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-08	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-09	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-10	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-11	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
50Mg-R526-12	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGCTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

8. APÉNDICES

Tabla A8. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs mutagénicas con incremento de MgCl₂ en la mezcla de reacción, con NS2 como DNA molde. La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. El prefijo 10 de los nombres de las secuencias hace referencia a la concentración mM final de MgCl₂ en la PCR. En la columna “Secuencia 5’-3’” se indican en rojo las posiciones con mutación. La columna “Nt” hace referencia a la posición del último nucleótido analizado en cada bloque del alineamiento.

Nombre	Secuencia 5’-3’	Nt
10Mg-NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-06	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-07	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-08	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-09	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
10Mg-NS2-10	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5’-3’	Nt
10Mg-NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-08	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-09	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
10Mg-NS2-10	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

Nombre	Secuencia 5’-3’	Nt
10Mg-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
10Mg-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
10Mg-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
10Mg-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
10Mg-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
10Mg-NS2-06	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153

8. APÉNDICES

10Mg-NS2-07	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
10Mg-NS2-08	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
10Mg-NS2-09	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
10Mg-NS2-10	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
10Mg-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-08	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-09	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
10Mg-NS2-10	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
10Mg-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-07	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-08	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-09	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
10Mg-NS2-10	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
10Mg-NS2-01	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
10Mg-NS2-02	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
10Mg-NS2-03	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
10Mg-NS2-04	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
10Mg-NS2-05	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
10Mg-NS2-06	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
10Mg-NS2-07	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
10Mg-NS2-08	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
10Mg-NS2-09	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306

8. APÉNDICES

10Mg-NS2-10	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
10Mg-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-06	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-08	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-09	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
10Mg-NS2-10	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCCCTCGCTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
10Mg-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
10Mg-NS2-10	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
10Mg-NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-06	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-07	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-08	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-09	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
10Mg-NS2-10	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
10Mg-NS2-01	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-02	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-03	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-04	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-05	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-06	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-07	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-08	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-09	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
10Mg-NS2-10	CTCACGTGTG T AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510
NS2	CTCACGTGTG C AGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
10Mg-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
10Mg-NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAAAGTAGGG	559

Tabla A9. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs mutagénicas con incremento de $MnCl_2$ en la mezcla de reacción, con R5-26 como DNA molde. La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. El prefijo 0,1, 0,5 y 1 de los nombres de las secuencias hace referencia a la concentración mM final de $MnCl_2$ en la PCR. En la columna “Secuencia 5'-3'” se indican en rojo las posiciones con mutación.

Nombre	Secuencia 5'-3'
0,1Mn-R526-07	AGGC T GGAGTAATT T TCAC C AACCAT T GCGCT T GGCAGTG
0,1Mn-R526-08	AGGC T GGAGTAATT C TCAC T AACCAT T GCGCT A GCAGTG
0,1Mn-R526-02	AGGC T GGAGTAATT T TCAC T AACCAT T GCGCT T GGCAGTG
0,1Mn-R526-06	AGGC T GGAGTAATT T TCAC T AACCAT T GCGCT T GGCAGTG
0,1Mn-R526-05	AGGC T GGAGTAATT T TCAC T AACCAT T GCGCT T GGCAGTG

8. APÉNDICES

0,1Mn-R526-04	AGGC T GGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,1Mn-R526-11	AGGC T GGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,1Mn-R526-03	AGGC T GGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,1Mn-R526-10	AGGC T GGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,1Mn-R526-01	AGGC T GGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,1Mn-R526-09	AGGC G GGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,1Mn-R526-12	AGGC C GGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
R5-26	AGGC T GGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
0,5Mn-R526-01	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-03	AG G CTGGAGTAGTTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-15	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTCGGCAGTG
0,5Mn-R526-09	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-11	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-13	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-04	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-07	AG A CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGTGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-12	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-06	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-05	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-10	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-02	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-08	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
0,5Mn-R526-14	AG G CTGGAGTAATATTCATCAACCTTTACGCTTGGCAGTG
R5-26	AG G CTGGAGTAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Nombre	Secuencia 5'-3'
1Mn-R526-03	AGGCTGG A GTATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-04	AGGCTGG A GTGATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-01	AGGCTGG A GAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-02	AGGCTGG A GAATTTCCATCAACCATTGTGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-08	AGGCTGG A GAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-05	AGGCTGG A GAATTTTCATCAGCCAATTGCGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-09	AGGCTGG A GAATTTTATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-06	AGGCTGG A GAATTTTCATCAACCATCGCGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-07	AGGCTGG A GAATTTTCATCAACCACTGCGCTTGGCAGTG
1Mn-R526-10	AGGCTGG G GAATCTTCAACCAACCATTGCGCTTGGCTGTG
R5-26	AGGCTGG A GAATTTTCATCAACCATTGCGCTTGGCAGTG

Tabla A10. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs mutagénicas con incremento de $MnCl_2$ en la mezcla de reacción, con NS2 como DNA molde. La tabla no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. El prefijo 0,1, 0,5 y 0,75 de los nombres de las secuencias hace referencia a la concentración mM final de $MnCl_2$ en la PCR. En la columna “Secuencia 5’-3’” se indican en rojo las posiciones con mutación. La columna “Nt” hace referencia a la posición del último nucleótido analizado en cada bloque del alineamiento.

Nombre	Secuencia 5’-3’	Nt
0,1Mn-NS2-11	TTCCTCCTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-04	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-02	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-06	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-03	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-07	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-09	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-10	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-12	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-08	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-01	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,1Mn-NS2-05	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC A CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCT T CTCCTGGCGGACGC G CGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5’-3’	Nt
0,1Mn-NS2-11	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-04	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-02	C C GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-06	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-03	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-07	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-09	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-10	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-12	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-08	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-01	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,1Mn-NS2-05	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	C T GATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-06	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-07	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-09	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-10	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-12	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-08	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
0,1Mn-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-09	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-10	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-12	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-08	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGTGGCATATGCTTTC	204
0,1Mn-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGGGCGGCATATGCTTTC	204

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-07	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-09	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-10	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-12	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-08	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

8. APÉNDICES

0,1Mn-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
0,1Mn-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-04	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-02	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-06	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-03	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-07	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-09	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-10	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-12	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-08	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-01	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
0,1Mn-NS2-05	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-06	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-03	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-09	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-10	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-12	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-08	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,1Mn-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCCTCGCTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACACAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACACAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACACAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACACAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-03	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACACAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACACAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACACAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408

8. APÉNDICES

0,1Mn-NS2-10	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-12	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,1Mn-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCGCCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-04	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-02	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-06	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-03	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-07	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-09	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-10	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-12	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-08	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-01	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
0,1Mn-NS2-05	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCCCCCCTCAACGTCCGGGGAGGCCGCGATGCCATCATCCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-06	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-07	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-09	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-10	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-12	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-08	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
0,1Mn-NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTTGATATCACCAAACCTTCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,1Mn-NS2-11	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-04	ATTGCCATACCCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559

8. APÉNDICES

0,1Mn-NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-12	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,1Mn-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGACGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-12	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-07	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-06	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-08	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTCGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-02	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-09	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-10	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-05	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-01	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-03	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,5Mn-NS2-11	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGACGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TTCCTTCTCCTGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-12	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGCGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-08	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-02	CTGATAGCCCAGGTCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-09	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-10	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-05	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-01	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,5Mn-NS2-11	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-12	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-07	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-06	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-08	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-09	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-10	GCGTCCATTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGTATACTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACAGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGC	153
0,5Mn-NS2-03	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCATGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
0,5Mn-NS2-11	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-12	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-08	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-09	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-10	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC CGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-05	GCCGCTTGATACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-01	GCTGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCGGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,5Mn-NS2-11	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCAC-ACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-12	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-07	TATGGTGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-06	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-08	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-09	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-10	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255

8. APÉNDICES

0,5Mn-NS2-03	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
0,5Mn-NS2-11	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTACTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACACGAGCT	255

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-12	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-07	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-06	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-08	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-02	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-09	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTACATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-10	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-05	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-01	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-03	TATGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCAGTTT TT TGTG	306
0,5Mn-NS2-11	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCAGTTT TT TGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCGGAGGCGCGGTTT TT TGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	GGTCGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-12	GGTCAGGCATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-07	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-06	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-08	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-02	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-09	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-10	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-05	GGTC TGA CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-01	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-03	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC CCG CTAGG	357
0,5Mn-NS2-11	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACACGGTGTTCC TCG TTAGG	357
NS2	GGTC TGG CATTATTGACCTTGTCGCCATATTACAAGGTGTTCC TCG CTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,5Mn-NS2-12	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,5Mn-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGTACTTGCAT	408
0,5Mn-NS2-06	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,5Mn-NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,5Mn-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAT	408
0,5Mn-NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCGCACTTGCAC	408

8. APÉNDICES

0,5Mn-NS2-10	CTCCTATGGTGGT T ACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCG C ACTTG CAT	408
0,5Mn-NS2-05	CTCCTATGGTGGT T ACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCG C ACTTG CAT	408
0,5Mn-NS2-01	CTCCTATGGTGGT T ACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCG C ACTTG CAT	408
0,5Mn-NS2-03	CTCCTATGGTGGT T ACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCG C ACTTG CAT	408
0,5Mn-NS2-11	CTCCTATGGTGGT T ACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCG C ACTTG CGT	408
NS2	CTCCTATGGTGGT T ACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCG C ACTTG CAT	408

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-12	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-07	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-06	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-08	G C GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-02	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-09	G T GTGGGTTC C CCCC CTC GACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA C CCTC	459
0,5Mn-NS2-10	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-05	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-01	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-03	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
0,5Mn-NS2-11	G T GTGGGTTC T CCCC- TC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459
NS2	G T GTGGGTTC C CCCC CTC AACGTCCGGGAGGCCGCGATGCCATCA T CCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-12	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT GCCAAAC T TCCG	510
0,5Mn-NS2-07	CCCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-06	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-08	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC CAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-02	CTCACAT GTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-09	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T CTG	510
0,5Mn-NS2-10	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-05	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-01	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-03	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510
0,5Mn-NS2-11	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTG GTATC CACCAAAC T TCTG	510
NS2	CTCACG TGTGCAGTCCACCCAGAGC TAATC TTGATAT CACCAAAC T TCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,5Mn-NS2-04	ACTGCC AATACTCGGAC CGCTCAT G GTGCT CCAAGCT GGC ATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-12	ATTGCC AATACTCGGAC TGCTCAT G GTGCT CCAAGCT GGC ATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-07	ATTGCC AATACTCGGAC CGCTCAT G GTGCT CCAAGCT GGC ATAACTAGGG	559

8. APÉNDICES

0,5Mn-NS2-06	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGTTCCAAGCTGGTATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGACATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATAGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-01	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-03	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,5Mn-NS2-11	GTTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-07	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-09	TCCTTCTCCGACGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-10	TCCTTCTCCGACGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-08	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-04	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-02	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-11	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCACGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-01	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-06	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
0,75Mn-NS2-03	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51
NS2	TCCTTCTCCGGCGGACGCGCGCGTCTGTGCCTGCTTGTGGATGATGCTG	51

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	CTGATAGCCCAGGTCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGCGGCCCTCAACGCA	102
0,75Mn-NS2-07	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,75Mn-NS2-09	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,75Mn-NS2-10	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,75Mn-NS2-08	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTAGCCCTCAATGCA	102
0,75Mn-NS2-04	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTAGCCCTCAATGCA	102
0,75Mn-NS2-02	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,75Mn-NS2-11	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,75Mn-NS2-01	CTGATAGCCCAGACCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102
0,75Mn-NS2-06	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCATTGCA	102
0,75Mn-NS2-03	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCATTGCA	102
NS2	CTGATAGCCCAGGCCGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGCCCTCAATGCA	102

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCACCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-07	GCGCCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-09	GCGTCCGTTGCCAGAGCGCACCGTATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-10	GCGTCCGTTGCCAGAGCGCACCGTATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-08	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-04	GTGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-02	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATTCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-11	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-01	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-06	GCATCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
0,75Mn-NS2-03	GCATCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153
NS2	GCGTCCGTTGCCGGAGCGCACGGCATCCTCTCCTTCCTCGTGTTCTTCTGT	153

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-07	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-09	GCCGTTTGATACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-10	GCCGTTTGATACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-08	GCCGTTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-04	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-02	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-11	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-01	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGATCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-06	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
0,75Mn-NS2-03	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204
NS2	GCCGCTTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC TGGGGCGGCATATGCTTTC	204

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	TATGGCGCATGGCCGTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGAGCT	255
0,75Mn-NS2-07	TATGGCGCATGGCAGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGAGCT	255
0,75Mn-NS2-09	TATAGCGCATGGCCGTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGAGCT	255
0,75Mn-NS2-10	TATAGCGCATGGCCGTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGAGCT	255
0,75Mn-NS2-08	TATGGCGCATGGCCGTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGAACC	255
0,75Mn-NS2-04	TATGGCACATGGCCGTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGGAGCT	255
0,75Mn-NS2-02	TATGGCGCATGGCCGTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGGGCT	255
0,75Mn-NS2-11	TATGGCGCATG-CCGCTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGAGCT	255
0,75Mn-NS2-01	TATGGCGCATGGCCGTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGAGCT	255
0,75Mn-NS2-06	TATGGCGCATGACCGTTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCATCAGAGCT	255
0,75Mn-NS2-03	TATGGCGCATGACCGTTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCATCAGAGCT	255
NS2	TATGGCGCATGGCCGTGCTCCTGCTCCTCTTGACATTACCACCGAGCT	255

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	TACGCCATGGTCCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-07	TACGCCGTGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-09	TACACCATGGACCGGGAGTGGCTGCATCGCGCGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-10	TACACCATGGACCGGGAGTGGCTGCATCGCGCGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-08	TACACCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-04	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-02	TACGCCATGGACCGGGCGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-11	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-01	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-06	TACGCCACGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
0,75Mn-NS2-03	TACGCCACGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306
NS2	TACGCCATGGACCGGGAGATGGCTGCATCGTGCAGAGGCACGGTTTTTGTG	306

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	GGTCTGGCATTATTGACCTAGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-07	GGTCTGGCATTATTGACCATGTCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-09	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-10	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-08	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-04	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-02	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-11	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-01	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-06	GGTCTGGCATTATTAACTTGTGCGCCAGTTACAGGGTGTTCCTCGCTAGG	357
0,75Mn-NS2-03	GGTCTGGCATTATTAACTTGTGCGCCAGTTACAGGGTGTTCCTCGCTAGG	357
NS2	GGTCTGGCATTATTGACCTTGTGCGCCATATTACAAGGTGTTCTCGCTAGG	357

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGCAT	408
0,75Mn-NS2-07	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGGGCGCACTTGCAT	408
0,75Mn-NS2-09	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGAT	408
0,75Mn-NS2-10	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGAT	408
0,75Mn-NS2-08	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGCAT	408
0,75Mn-NS2-04	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGGGCGCTCTTGCAT	408
0,75Mn-NS2-02	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGCAT	408
0,75Mn-NS2-11	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGCAT	408
0,75Mn-NS2-01	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGCAT	408
0,75Mn-NS2-06	CTTCTACGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGCAT	408
0,75Mn-NS2-03	CTTCTACGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGCAT	408
NS2	CTCCTATGGTGGTTACAATATCTTATCACCAGAGCTGAGGCACACTTGCAT	408

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-07	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-09	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGC-GCGATGCCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-10	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGC-GCGATGCCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-08	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-04	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-02	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-11	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-01	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-06	GAGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
0,75Mn-NS2-03	GAGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459
NS2	GTGTGGGTTCACGTCGCGGAGGCCTGTCATCATCTC	459

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-07	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-09	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-10	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-08	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-04	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-02	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTTATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-11	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-01	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-06	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGCATATCACCAACTCTG	510
0,75Mn-NS2-03	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGCATATCACCAACTCTG	510
NS2	CTCACGTGTGCAGTCCACCCAGAGCTAATCTTGATATCACCAACTCTG	510

Nombre	Secuencia 5'-3'	Nt
0,75Mn-NS2-05	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-07	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-09	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-10	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-08	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-04	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-02	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-11	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-01	ATTGCCAAGCTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-06	ATTGCCGATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
0,75Mn-NS2-03	ATTGCCGATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559
NS2	ATTGCCATACTCGGACCGCTCATGGTGCTCCAAGCTGGCATAACTAGGG	559

8.3. APÉNDICE III

Tabla A1. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs de la población combinatorial inicial (00DINI) y de cada ronda (DS01 – DS08) del proceso de DS. El alineamiento no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. Los dos números finales del nombre de la secuencia hacen referencia al número concreto del aptámero individual clonado.

Nombre	Secuencia 5'-3'
00DINI08	-----TTACGTATTAGGCTTCGAGACACTA-ACGGTTATCAGTATC-----
00DINI28	-----GTGTTATGAAATTATAGGCGTCTCGTAACTAGACGTTA-----
DS0329	-----GGCCTGGCGTACTAATGATGGCGGCTCCA-AAGTTTCTACG-----
DS0222	-----ATAA-CGTATTTGCTGGCCGCGCAATTATTT-TTCTCTGTTC-----
DS0306	-----GTAGGCGTCCTTGATGGTGGCTCG--TACTT-CCCTTTGTGAT-----
DS0213	-----ACCGGACTGATCTACAATTTCCA-TGGAGGTCACTGCGCTC-----
DS0513	-----CGATTTATTTCGACACAACGACAATTTTCCCA-TAGGAGACAC-----
DS0110	-----TCCATTTGCGCAAGGG-AAAGTTCCCT-CGCTCGTTGCTGCC-----
DS0520	-----GGCCTGATGGTACTACGATTTCTATAGTGACCTACTTGC-----
DS0803	-----AGGAGAGACCTCATGATTTCCACTACTGAACAACATCTCG-----
00DINI41	-----GAACGGTCTTTTCGTATCACCTAATTCTGGTTGGGGGGCCA-----
DS0320	-----GAGCATTTCTTAACGACTACTACCGGACAGGG--TCAATTCGC----
DS0628	-----AGATTTATTGGAGGTCACCGAAGCAGTATAAATTCGTGAG-----
DS0715	-----ACGAAATTACCTTAGTAGCGCAAATTACTGGTGATCTGTTG-----
DS0106	-----CTGTCTAGAATTGTGTGCGAGGCACCATATAGCCGCTGTTG-----
DS0717	-----CTTCGCGATTTCTTTAGTTTTCACCTTCTCGTTGTTGTTGG-----
DS0203	-----CTCATGTTGTGTGGTGCCCCAAAAGGTCCTAGTTGGACG-----
DS0826	-----TAAATTCCTTCCATATAAC-TTCTAGTAAGATACGCCTTTC-----
00DINI01	-----TAATCCAGAAGTAGCCCTCCGCCCTCACTTAATGATGTGT-----
DS0126	-----GAGCTGTGCACTCAGCTTCAGCGCTAA--TAATTATGTGTCG-----
DS0130	-----CGGATGCGTAATTCAGGCTC-ACCCTGTTCCATTT-TGTAGG-----
DS0506	-----GCAGGTTTAAAGTCTGCATG-GCCCTCTTATATTTCTGTGCG-----
00DINI02	-----GACTGATGAGCCGGT-GT-GTTGTGATATGGTATTATTAGT-----
DS0104	-----AGCTGATACGGAGGTTGT-GTTGTCACTTGG-GCGATCTGTT-----
00DINI10	-----TCACGGTGATTGTGCTGCTCATTTTATTCTTTGGCTAGCT-----
DS0830	-----ACCATGCTGCCTGT-GAGTTCAATTTTATTTATCCTAGT-----
DS0416	-----CGGAGGCACAGGGTGCCTG--ATGCACGTTTGTGTTGATGCG-----
DS0417	-----CGGAGGCACAGGGTGCCTG--ATGCACGTTTGTGTTGATGCG-----
00DINI04	-----TCAAATGCAATCATGCTGGGACCGGAG-GTGTTTGCTATTT-----
DS0727	-----GTGTGCCGGGCCGTTTGTGTGCACTATTTTTCATTTAT-----

8. APÉNDICES

DS0302	-----GACTGTTC---GAGGGTTACTGTGCCCAATGTTTGCCTGCGCT-----
DS0303	-----CGGACTCGAT---ATCAAGTGTTATGTCTCAATCATGTTTGGT-----
DS0804	-----AGACCGTAGCAAAAGAATGATTATGTACGCTACATTTTTG-----
DS0820	---GTGGTTTTTCATGGCCCTATCTATTCAATCACTTTTACG-----
00DINI07	-----GGCCCGTTAACCGTTCGTAGTGATA-AGATTGGTTATGGTG-----
DS0625	-----ATTTACACATTTGTACTCATGCAAATTGGTTGTCCTGGTG-----
DS0305	-----TGGTATCTCACACAGGTGTCAGCGCGCAATTTGCGTATCG-----
DINI09	-----TTGGTCATGCTGGAGCAGCTATGCTCGAGCAGTGCGGTCG-----
DS0505	-----ATATGCTATACTTGACCTGCTTCGCGCCCTCAGTACACAG-----
DS0101	-----CCCATACATAGCGT-TACGCTGAGGCTAGCACTGCTTCCGG-----
DS0127	-----CCCATACATAGCGT-TACGCTGAGGCTAGCACTGCTTCCGG-----
DS0330	-----CCCCAGGTAGC-T-GAGGTTGAGTGCAGCACCGCGAACTGAG-----
00DINI38	-----CGACGTGTACGAGTAGCGCGTTAGATCAGGTTAACACTTT-----
DS0201	-----ATCAGCCGATAATGCGGGCGCACCTTTCTCATATTACACA-----
DS0423	-----AGTATTATTTCGATGATGCTTACCCTCCCTT-TCACACCTCC-----
DS0225	-----AATTTTTCAGCGCAGTGAGCGGTTATTGCGGGCGGAAGTCT-----
DS0509	-----TCTGGCCCTTCATTTGCCGATATCGCCCAGGAGGGGGTT-----
00DINI17	-----CCGGCATGATCGTACATCTTTTTG--GTCCTCTTCATCACC-----
DS0411	-----CGGGGCTGCAAGCTGTAACATGCCGTTGT-GCCCTCTCCCT-----
DS0731	-----CGCTTTCGGCGCCCGGG-ATGCTGGTGA-TATCTGTATGGGG-----
DS0817	-----ATACTGGGCATGCAGGCATGTTGGTG--TTTCTGTATGTTGG-----
DS0405	-----ACAGCGGTAGTGCTGTGTGTGAT-GTAAGATACCATCTGCG-----
DS0605	-----GCAACC-CACTTCCGCAACCGGCAGCGTGGAGGTGTATGCG-----
00DINI27	-----GTATCCTAGGTAGAGAGCGAGAAGGGAGCTCGCTTGGTTC-----
DS0331	-----AGGGCCCCTGCCTCTCGGGAGGAGGTGAACTCGCTGGCAT-----
DS0413	-----GTGCGGGATGA-CTCCCGTGTGTGA-GTGACAGATCCTTTT-----
DS0601	-----TAGAGATGAGGGAAGAGCTCCAGTGTCTGCCGTGGTATGG-----
00DINI31	-----GTGAACCAGCTGAAATGGGGTGCCGGCGCAGGATGTGCTT-----
DS0212	-----AGTCCCTAATATAGGGTTTCGGGAGGTGGGGGAGTTTTTC-----
DS0705	-----GGAGGACCAAGATGGGGAGCGGGTGCTAGCTACAGTTTC-----
00DINI39	-----TGCTTTTGTGTGAT-CAAGCTGGCCTGCATGTGGATTGTTAA-----
DS0525	-----ATGCATTAGCAGATGCAATGTGGCAGGCATGTAT-TCGCCG-----
DS0301	-----ACTGTAACGTGGAGAACAGGTACCGTAGTTCACGCCGGCC-----
00DINI11	-----TTACTGTACCTAAGACGGTGCGCCTCTTCGTATGGATCCC--
DS0321	-----GAAATGTGATGCCTATTGGACCT--GGCGGTG-GCATCTTTAG-----
DS0418	-----ATATGTGTTTTTTGACGATCGCT--TGCCGTCCGT-CATGTTAT-----
DS0729	-----GTTGATTATTTAAGTTTTCC--TGCCGTTCGCATGTGTTGC-----
DS0403	-----TCTATTGTCTATCTGAGCG--TGCCGCGTATTGTTCCGTT-----
00DINI13	-----TCCCAGAGCCCTTCGTCCAGATC-GGTTAAGTGACTAGTT-----
00DINI24	-----TCCCAGAGCCCTTCGTCCAGATC-GGTTAAGTGACTAGTT-----

8. APÉNDICES

DS0218	-----CCGATGTGGCAGTGCCCGTACCCGGGTGCGCATTCGTAT-----
00DINI15	-----ATCTTAGTTGACAATTCTTCGCTTGCGGACTTCTGACGC-----
DS0216	-----CGGCCTAATAGGTTGAGACTGTTTCGCTTACCTCATCCTGA-----
DS0429	-----TCCAGGTTCTACGCGCGTTCGACTTGCGCCCTCCTCTCCG-----
DS0108	-----CATCTCCGCTCCCTCGTCCGCCATCTCTTCTCTCGTTGGG-----
DS0115	-----AGATGGGTCACTCTCGCTACAT--TTCGTCTTGCTTTCTTCT-----
00DINI12	-----TCTGCAATGGAAGTACGCGCCTCACCGATTCTGTTCAAT-----
00DINI26	-----TCTGCAATGGAAGTACGCGCCTCACCGATTCTGTTCAAT-----
DS0129	-----CTTCCGCTACGGCATGCGGCCGCTCACCTTTATTGGCAA-----
DS0502	-----GATTACTCTTATCTGCCATACAGCTGTGGGGTCAAGCTCC--
DS0828	-----TAGAGTTTCGTGTGGCCTTTGATCACCTATTCAGCTCTGTG-----
DS0420	-----CCCAAATCTGCTGCTCTCCC-TTTACCCCTCCTTTTCTGTG-----
DS0809	-----ATGAAATCAGATGACCTTATGTTTACCTCTTCGGTTATGC-----
DS0414	----TGATGCCACTCTTGAAAT---ATGCATGTACGTTAACCCCTGC-----
DS0102	-----CGTCTTTAATGTAGATACCATGTGTTCTCT-TCCGTGATAA-----
DS0721	-----GACTTCAACCTGATAAGCTATGATTCTCTTCGTTGTG-----
DS0603	-----ACTTCACCTGTTACCCGGCTTTC-TCCGTGATATGACGTT-----
DS0832	-----TTACAGCCCCTGCTACG-GGTTTTA-TGCGTGTACTTTTGT-----
DS0229	-----GATGACCCCGTC-AATATCCATGCGGATGTG-TGCGTGTTC-----
DS0230	-----GATGACCCCGTC-AATATCCATGCGGATGTG-TGCGTGTTC-----
DS0215	-----GGTAGCGCGGTTGAATCGCCATACCGTTGTA-GGC-TATTAT-----
DS0323	-----CGACAAATCCGG-GTTAATGCTCGTTACACGTCCTCTC-TGT-----
DS0617	-----ATATCCAGTGTCAATCATCCATGCACTTGCAATCATGAGG-----
DS0113	-----AGTTTTTTTACGCGGCGAG-GCCAATTGTCAATACACATTA-----
DS0219	-----CGGTCTCTTACTGCTTTTATGCTATTAGGCGAGCGTGGG-----
DS0607	-----TAATTCAGCCGATACTCTAACAGCCT--ATTCCATTACATTC-----
DS0208	-----TGGCTTACCCCTTCTGAACTCAACTGGCCAGTTCTATCAT-----
DS0223	-----TGGCTTACCCCTTCTGAACTCAACTGGCCAGTTCTATCAT-----
DS0517	-----GTGACCGATCACACCTGTATACCTTAACTATCCATAATTG-----
DS0428	-----TACACATGTAACCGTTCGATCTAAACCCTGAGTCCTTGG-----
DS0511	-----TATATCTCACGACTATATACCCGACTTCGCCCTACTGGTG-----
DS0823	-----AGGCCGGAGAGTCACTTGTATATAACTTACTATGTCCATC-----
DS0224	-----GGACACTG-ATACTCGTCGAGCCGTCTCTAGAACTTAGATG-----
DS0722	-----CCACTGCATTCTTTTTTAACCGACGTTACATCCTAGGACC-----
DS0821	-----TGCATGCCGATATAGCCCATCTGTTCTATTCCTTAGGG-----
DS0831	-----AGTGAATGTGTGCATGCCTATTTTACAATTGCTCCATTAC-----
00DINI40	-----AGTCGCTTTTTCTAACTAAGACCGGAAATTCGTTTATGGT-----
DS0805	-----CCGACGGGAACTGGTTATACTTCTCCTTACAAGACCTGCC-----
DS0526	-----GAGGATCGTTACAGGGACCGACTGCATTTATGGCTCAGTG-----
DS0622	-----TCTCACTGGGACCGGCTGCCTTTCTCTCACAATTTGTTCG-----

8. APÉNDICES

DS0307	-----ATGTGTGAATCCTTCC-CAGGTGCCCCGTCTTGTGATTGCC-----
DS0616	-----AGTCAATACTTCCACGGGTCTTCATATGTGATTAAGTGG-----
DS0107	-----CGCGGTCTTGCATAAGTCCATACATGGGT-CCCATCGAGTG-----
DS0609	-----GTATCACAGTTGTTGCTGTATATAGC-TCACATCTACCTG-----
DS0610	-----TCTAGATGACGGTTGGCCAC-GAACACAGC-TCAAATCTGCG-----
DS0206	-----GCGTATTACGTTTG-TTGC-GTATATGGCCTTTTCTCTATAT-----
DS0207	-----GGTTCATTTCGACGT-GTAGGGCTAACAGTTGTTGAGCCGT-----
DS0718	-----GTAGACGTTGCAGGGCAGTCAATTTTTCGCTTATTTCTG-----
DS0518	-----GCGGTTACGGCTGGCGTAAATTCCTCGGTTAGTGTACTCG-----
DS0710	-----TTTCAGACCAGGTCGGCTTGTCGGAATATTTTTCGCATGG-----
00DINI14	-----CCGTGTGTGGCGTGTTATTGAATTCGAGATAATGGCTT-----
00DINI30	-----CCGTGTGTGGCGTGTTATTGAATTCGAGATAATGGCTT-----
DS0620	-----ACAACCTACGGCCCTATGTAGGC----TTATAGACTTGAGTCTG-----
00DINI18	-----TCACGCGCAGTTTTTCTCATAGGTAC--GTGGCGTCTGAGAG-----
DS0706	-----AATTGTATCTGAGGTACTGGCGGCAACTTCTATTTCCACG-----
DS0112	-----GAGGCAAGTCGAAGTCGCCAGATGTTGGGTCTGTTTTTGG-----
DS0629	-----CCTAGACGC-TATAAATTGC-GGACATTATTTGAAATTACGG-----
DS0116	-----CATTGAGGCTTTTTGACCGGCGTCAAAAACGCTACGTTT-----
DS0712	-----GCGACGCGTATCGGCAAGTATCAATTACCGCTGTTTTTCG-----
DS0122	-----CGTGGGGTACCGTGATCAATAAGGCCCTTTATTTTCTATTA-----
DS0322	-----GTCACAGACAATGATTGTTTGAGTGAAAGTACTTAGGTTA-----
DS0326	-----GTCACAGACAATGATTGTTTGAGTGAAAGTACTTAGGTTA-----
DS0630	-----GCGTAGAGGTTCTTTGTGTAGGATGAATTACATTAACGGT-----
00DINI36	-----CGACTTAACTAGAAGTCATTCGGCTGGGGGATACCTTCTG-----
DS0612	-----TACTCTCTGATAGTGAATACATAGATAGTATTTTACTACG-----
DS0724	-----CCTTCCTTTCTCAGA-CGAGGGAATACAT--CCGCCCACTGT-----
DS0204	-----ATGTTACATTGTTTC-CATGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGT-----
DS0210	-----ATGTTACATTGTTTC-CATGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGT-----
DS0227	-----ATGTTACATTGTTTC-CATGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGT-----
DS0114	-----ACCCTGGTTTGTACACAGGTACAGCACTCGTGGGAGACT-----
DS0431	-----CAGAGTATGGGTGGGCGCGATAGTACTGCATTAAAGCCG-----
DS0519	-----TAGTGTAACCTGCATGCGTGATATTAATCCACTGAACCTG-----
DS0512	-----GGTGAGTTGGGTCTCTATTTGCCTCGTGGTTGAGTGCGGG-----
DS0515	-----AGCGGTGCTACTGCTTTCATCGCTGTTAATTTCTGGGAGT-----
00DINI22	-----CTTAATAATCGTGG-CATGAGAGGAACGAGTGCAGCAATCG-----
DS0226	-----ATAAGTAGCCGGGGACATCTCGGGTTACGGGGGACTTGTG-----
00DINI25	-----GTATCCGTATC--ATGATTCGATCGTTGCCGGTTAAAGCGTT-----
DS0523	-----CGTGTCAGTAGC--AGGACTTAAACGTCATAGATCACTTTGTA-----
DS0105	-----CGTGTCTATCTGGGTGTACAACG-CCGACGCTTTTAAGGTG-----
DS0220	-----TGTCGGGGTTTATTACTTCCCACTCTGTCAACATGATGCC-----

8. APÉNDICES

DS0111	-----TTTAGTCGTCCCATTTAAGGTCGTATGAGTGATGGGTCGA-----
DS0514	-----TTTACTTCAATTCGTCTCTTGATGAGGTCAGCAGACGTGT-----
DS0802	-----GCAGCCATTGACTTCTTCATCAG--CACCGCCGTTTTAGTA-----
00DINI03	-----CCTATCAACCGTCTTTC-CTGGATTGAGAAGGGTTTTTCG-----
00DINI37	-----ATGATTGCTTC-ATTGAACTAGTAACGGTTTATGGATCGGT-----
00DINI19	-----TCTATGTGTCTAC-ATTTCGTCCAGCGGGTTGAGGCGGTTT-----
DS0529	-----GACTGGGCGCCTAC-ATAGGCTTCGTAACGCTGT--TTGTTT-----
DS0128	-----CTCGCTAACTCGTTCTGTTT-ACATATCGCGGAGCGCCATA-----
DS0117	-----ACCAGCGTGCTCGT-ACGGAGCCCACTGGGGTTTCTCTATG-----
DS0410	-----CTCGCAGGGGGGTCGTCAATTTAGACCACGGTGTTTTGTTC-----
DS0211	-----GCC-CACTAGG-AGTTTCGTTACGCT-TTCGGGATGCGCGTG-----
DS0232	-----GCC-CACTAGG-AGTTTCGTTACGCT-TTCGGGATGCGCGTG-----
DS0214	-----TTACGCGATATTTGA-AGGTGCTTCACGCTGTTCCGGTCTGC-----
DS0516	-----GATTGGACGAGTTAATCGG-AGTGGTGTTACGAC--TTCA-ATG-----
DS0527	-----TGGAGCGGTCAATTCT-CTGGGTACGCCTT--TCTACACGTG-----
DS0531	-----AAGCGGTTGAAACGTGTTCTCTACTACTCGATTATAAG-----
DS0725	-----TGTAAGTTGAAGTCACGGGATTCTAACGCGATTCTAAG-----
DS0816	-----GGACACCTTTTTT-ACGTGATCACGACGGGTCTATTCTGTT-----
DS0825	-----ATAAATATTTGTGGAAGTAATCCCATGGGGTTTTTTCGG-----
DS0719	-----ACACTGCCTTTCTCCCTCAACATGCGCTTACCGTTTGTA-----
DS0822	-----CTCCATGTTTCTACCTGCACAG----TACCCTTTCTACCGGGC-----
00DINI05	-----TTACCCTTATTCTCCCGGATTCTTCGCGCTTAGGTCCTGT-----
DS0205	-----ATTGCGGTTGGGGGCTTAATTGTCT-CATTCCGCTTGTCT-----
DS0524	-----GACGACTAAGGGGCTTACGACCT-CATTCTGCTTCTCAATA-----
00DINI21	-----TTTCACAGTGCC-CTGTATATCGCTATGCAATCCCCCGGCA-----
DS0812	-----TGTGGTCACTATGTCTCTGATTCTCTCCATGCCACACAG-----
DS0627	-----CAAACCTCTATCGTTCTACAGTGCCCCATTTCTCACATA-----
DS0806	-----GACTACTACTATATT-TACGGGTTCTATTCTTCACAGTTCC-----
DS0402	-----CGATGATCATTCTACCATTTCCATACCTTCGCTTTTTGC-----
DS0424	-----GAAGACTTCTACTAT-CCGTAACTTCCCGTTACGAACTCG-----
DS0807	-----TACAAAGAACTAAGCCGTATCTATCGGTTTTCTATCCCG-----
DS0422	-----GGACATGTGGCCGCGGTACGAACTTTTTACCTTTTTGTA-----
DS0623	-----TTTGCTGTATAGACTTG-TACCT-CGCTCGTAACTTTCTGAG-----
DS0504	-----GAGTCGCTCGGTGCG--TTACCGGTCCTTCATACTGCGTTAC-----
DS0608	-----TGACGGCATCCGACGGCTTAAGTGTCTTCTTATATCCTG-----
DS0624	-----TGAACGCAACATCGACGGTAT--TTATGTGTTCTTCGACTG-----
DS0704	-----GGGTGTTCAGCGGAACGGTGTCGTCT--TAACCTATTCTTC-----
00DINI06	-----TAATGGGTGGAATGGTATTTT-CTTGGTTGTTGTGCTCT-----
DS0815	-----TGGATGTTACTATTTTGTGACATGTTTGTCTTCTATC-----
DS0818	-----ATCCTTCCACAAGCCATTTTGTGACCCGCGTGTCTCCTA-----

8. APÉNDICES

DS0707	-----AGAAATAAGACATATTTGTGTGTTAGGCTCACTCTCATAT-----
DS0708	-----AGAAATAAGACATATTTGTGTGTTAGGCTCACTCTCATAT-----
DS0407	-----TGCTAAAC-CCTTTGCTTTTGTGGGTTGCTCCCATATCACG-----
00DINI16	-----CTGCGCCGGAATATTTCCTAGTTAGTTTTCGTATTGACC-----
DS0827	-----ACGTATATAGTAGATTTTTTTTCCTTCTCACTAACCACGG-----
DS0231	-----TGTTTATTTGACACTCTTTGGGTTTGATTACCCCTATAAG-----
DS0311	-----GTTTGCTGCTCCAGATTATTG--TTTAGTTTTTATTTCCCA-----
00DINI42	-----GATATTATATATTGCGTGAGATCGATACTCGTTATCGTAT-----
DS0406	-----TGGCCATCTGTGCCTGAAATTGCCTTATCGTATTCTCTT-----
DS0528	-----TAACATTTGTGTTAGATTATCCTGCGTAGATACGATACTA-----
00DINI33	-----CGCATTTACATGATTTTGCCT-TGTGGTACG-GTGTTGTCG-----
DS0415	-----TTGTTTCCCGTTCTGGTTCGTGTGCGTCACA-TTGTGTCG-----
DS0121	-----GGCGCGTGTTTTTCCCATTTGGGGTCAGTGTTATACTTGTT-----
DS0325	-----GTTACGTCTTACCCACTCGTCGTTGTGTGTTATTCATGT-----
DS0604	-----AGTCGCCTGCCCCAGGATTTTTTCAAGTGCCGTTAACTTT-----
DS0810	-----TCCGCGCCGTTGGTTTTTTCAGTTACATTTCACTATGGG-----
DS0730	-----TGTCTGGTGCTTCTAACCCCTTGATGTTACTTTTTTGCC-----
DS0824	-----AGGTGCTGCTTACTTTTTTCGTATTGCTGCGTTGCGTTCTG-----
DS0711	-----GGTTTTGCGATCGCTTGCCGATTAGTTTTTCTTCTTTGCC-----
DS0118	-----TGTAGGCACATCATGGTCCTGTAGAATTTTATGCTCTGTT-----
DS0618	-----GGCCACTTCA-GCTCCTTTTTGTGTATGTGGACTGTTACCT-----
DS0427	-----AGAATCCCTTTG-GTATATCGTGCATCCCATGGGCTGCTGT-----
DS0702	-----ATTTTG-GTTCATTG-GCAT--GATTATCTGCTGAACCCGGGG---
DS0228	-----GTAGCTTTTTCT-GCATCCCGACTGGCTTAGAAAAAGGATG-----
DS0319	-----TTGTAGCTTTGACTCGCAGCTCGTATCTCTTGCCCGGTTT-----
DS0312	-----GCTGACGGATATTTTAAT--TGAATCTCGTTTTTTCCTCGAAA-----
DS0606	-----GGGGAGTTTGGCAGTAATATAAATCATGAATCTCTTATTGC-----
DS0503	-----AGCATATGCTCTCTTAAT--CGCGGTACTTCACCCGGAATG-----
DS0813	-----TGAGTGAGTTATATGATTGAAT--CGCGTCTGCT--ACCCTG-----
00DINI20	-----TACGTTAATTCATGTGT-TAATGTGGACTTATCTGCGGAGG-----
DS0709	-----AAAGTCGAGTCTTGTTTTGCCTGACGGCTTATATGACTGC-----
DS0521	-----TCTAGAGTTTAGTCAATTGCTAATCTATAAGGCTCAATCG-----
DS0522	-----ACCCTACAGTTGCGTCAATTGGGGATTTACCGGATTTTCGT-----
DS0217	-----AGGATGTCCAACCACTTGGTTGGTGTATTCTGTGCGGCCCT-----
DS0621	-----CGCTAATGTCCATCGGGTTT-TTGGTGGAATTCGTTATTGG-----
DS0412	-----GAGCTCAGCTAAGACAAGCGGGTTTTTGATTCTACCTCGG-----
DS0404	-----GTCGAGACGCCGCTTATGGTTTG-TAGACTCCGTCCGTCC-----
DS0701	-----CCATAGGCTATACGCCACCGTTATGTTA-TGTGTTTCTTCC-----
00DINI32	-----AAGGTTTAGTT-CTATTTACATGATGGGTTTTCTTTTCGTG-----
DS0614	-----AATCAGTTACTGTTTTTCTGCTCGGTTCTCATTTAGAGGG-----

8. APÉNDICES

DS0123	-----TAGTGCCACCTAT-CTCAGGAGATTCACGTGTC-CCGTGTTC-----
DS0125	-----GCGTCATAGTTGCTCAATGGCTTCTGTGTCCTCCGTGCT-----
DS0425	-----TGCCTATTCATTTTCATGTGTCAACTACGGTGCACGGCGGG-----
DS0728	-----CGTTAGTTTTTCATTTT-TGTATTCACCA--GTGCCC GGTTGT-----
DS0713	-----GATTGTCATGGT-TGAATTC-CTTCTATACACGCTGGGACGG-----
00DINI23	-----GTCGACCTAACTTTAAGCTGTTGTCTATAAATATACCTCG-----
DS0324	-----GTTTGACTACCTATCTTT--GCTGATGACGGTTTGCTTTTCCC-----
DS0103	-----AGTCAGAAATCTGTTAGGTATAATATTCATCGAACCTTTA-----
DS0814	-----ATCAGAAGTCTTT--ATATACTTAACTTTGAATCATTTGTTGG-----
DS0602	-----ACAG--TTGGCTATGTTC---GGGT-CAAAGTTTAATATTTGTGT-----
DS0808	-----ATTGCTTTTGTATGTAC---AGAAGCGTAGTTCATATTCT-----
DS0314	-----GGGACT--TCATGTTA---AAATGGTTAGTTTAAAATCTGTCAGC-----
DS0419	-----AGGGACCCAGTTGT-TATTCGTCTAAGTGTCTCCCTTCC-----
DS0426	-----GTATACTTAAGTTT-T-TACCTCCGATTATACTCCTATACCG-----
DS0309	-----TGTGTGGACCTCAGTTTATAGTAGGTTCAGGATTTACACG-----
DS0120	-----GCGTACAA-ATCTCCTTAACTTAGAATCGTATTCATTTGTA-----
DS0221	-----TGCCTTTACTATCTTCATG-TTCAGGTCTATAGCC-TCAGCC-----
DS0421	-----GTTGTTGTAGATATGTTAGTTTTCAGTAGTATTGCGTCGT-----
DS0510	-----TGTAAGTTGATTATTGGTTTCTCTCCTCTATTA--GCGTCGGT-----
00DINI34	-----TATTGTATTT-TAGATATTTTGAATCCGAGTTTGTGCTATT-----
DS0720	-----ATCAGTATATTATTTATGTTTATTTTCGTACCTGAGTCGGG-----
DS0318	-----AGGTAGTGTGCAGTAC-TATCTTTTATGCATTCCGCATTT-----
DS0501	-----CACACGCAGAACCTGTAATTATGTACAATCCACACCTGC-----
DS0202	-----GGTTTCTATGTAAACTCTGTAC-ATTGCGGAGTTGCTGTT-----
DS0631	-----TGTTAATCTTTTCACTATCGGGGAGCTGGCGTGGTTGCG-----
DS0315	-----ATATGATTTTCATCTCTAGAATATTGTCTTATTTATGGGT-----
DS0409	-----TATGCCTTTAATATGTC--TACTACCATTCTTAACAACACC-----
DS0316	-----GTACAGTGCTGCTTCGCTGAAGGCGTCATTCTGATATACG-----
DS0819	-----TGCTGCTGCCC GTTACGCGT-ATTAGATCTACAATGCCGT-----
DS0327	-----CGGTTAT---TATTATCCAGCC-ATTATCATGAACCTTGGGATG-----
DS0714	-----AGTTATGTCACCTGTTGCGAAT-ATTATCATTTACTTTCGGG-----
DS0317	-----TTGGGATGCACGCTGCCGTAGACTACAGGACTTACCTCTC-----
DS0328	-----TTGGGATGCACGCTGCCGTAGACTACAGGACTTACCTCTC-----
00DINI29	-----GCGGGCTGAC-TAGATTG-AGGACATATTCTCCTGTATCCTT-----
DS0613	-----TGGCAAATGCTCTGTGTCTATGGAGT---GGCTTC-CTATACTT-----
DS0619	-----GGCAGG-GTTGACTGCTGTGTGTT-GGACATC-CTAACCTTC-----
DS0726	-----TCATGCCC GTTAAAGGAGTG-GGGCCACACTATACTCCCTGC-----
DS0124	-----ATCGGTGGACTACGACCAATTCTTAGTACATTGGGTACG-----
DS0401	-----ATCGGCCTTCGTTGGAGTGC-ACACAAT-CCTGGTACACGTT-----
00DINI35	-----GTCTCACTTCTTATCTACTCGGTCATGCTGTTGGACAGTG-----

8. APÉNDICES

DS0310	-----CGCCTCGGCATTCTAGTTGGAATAGGACCTCTATAACGCC-----
DS0508	-----TATGCGCTACGCACTGTGTAATCTAGATTAGTATACCCTC-----
DS0615	-----AGAGTCGCTGCTGAGTGCTACTTGGTCCTTAAATGGAGGG-----
DS0801	-----GCGTGTGGCTCCCGCGTCGCAATTCGAATTTAAACATTTC-----
DS0109	-----CACTTGAAATGCGTGATCAACATGCGGTTTGCAGTCGATG-----
DS0723	-----GGCTCTCTCGTTAAATGAG-GTTCAAGTTTCGCCTTTCTAT-----
DS0430	-----AGAAGCATGCGATTTCCGCCTCTTCTCTGTCTGACCATC-----
DS0716	-----ATCTCGGACAATAAAATGCAGCATCGATGTCCAC---GTACGG-----
DS0308	-----CCTAGCAACAAGGTTCCCGCCCCGGGAGACGTCAGACTGG-----
DS0408	-----TACTCCCTCCGCCACCAAAAAGGTAGCCGCACTGTCTAAG-----
DS0530	-----GCTTGGGTGTTACACGCCGTCG---AAGTATAATGCATTCTG-----
DS0626	-----TGGGGCTCACCCGCTCTCGGACCAAGTATAAT-CTTCCTAG-----
DS0304	-----GCAGTTCATATCCCCTC---GACTCATGGTTGTAAATTCAGG-----
DS0313	-----GTCAGATGGCCTCAGAAGACGTATGGTC-TAGATTGCGGGT-----
DS0703	-----CGTTGCCACAAGCACTCAGCCAATACGTGCCC-TGAACCTCT-----
DS0119	-----AGGGTACTGGTCCTAGTTTCCCGAAGTCTGCGTACCCAG-----
DS0209	-----ACATCTTCGGATAAAGAACACGCAGCTTCGCCACTTCGCA-----
DS0507	CAGGAATGCGCCAACTACTGCTAATG--CCCCTAATTTCCGCC-----
DS0611	-----ATTGTATTACGC-TACCTACTCTTGGTGCTCGTGTTATGTC-----
DS0811	-----TGTCCCCGAATGTGCGCTAATTATTAGTTCTCGGTGTGT-----
DS0829	-----CAGTGTGGTTCACCTAATAAATGATGTACCCCATGTGTGC-----

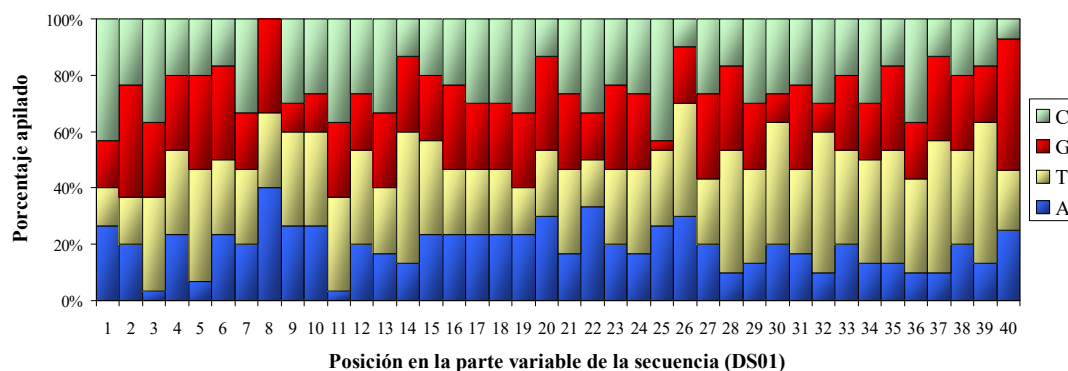


Figura A1. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 1 de la selección de aptámeros de DNA (DS01).

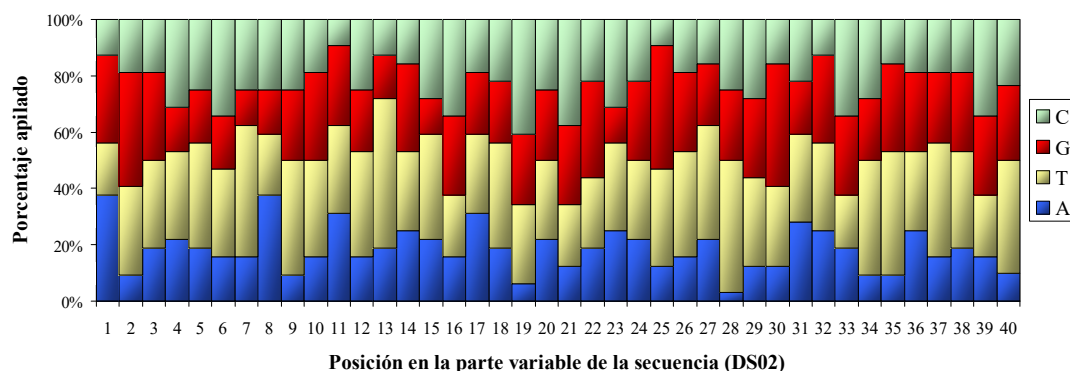


Figura A2. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 2 de la selección de aptámeros de DNA (DS02).

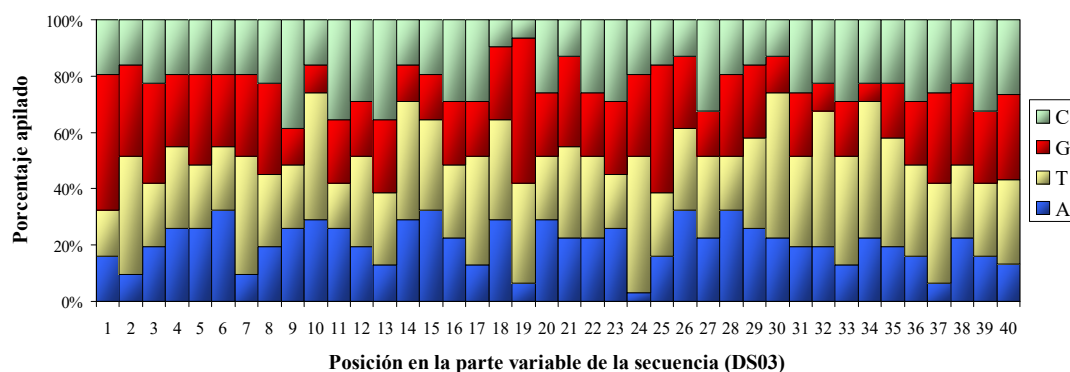


Figura A3. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 3 de la selección de aptámeros de DNA (DS03).

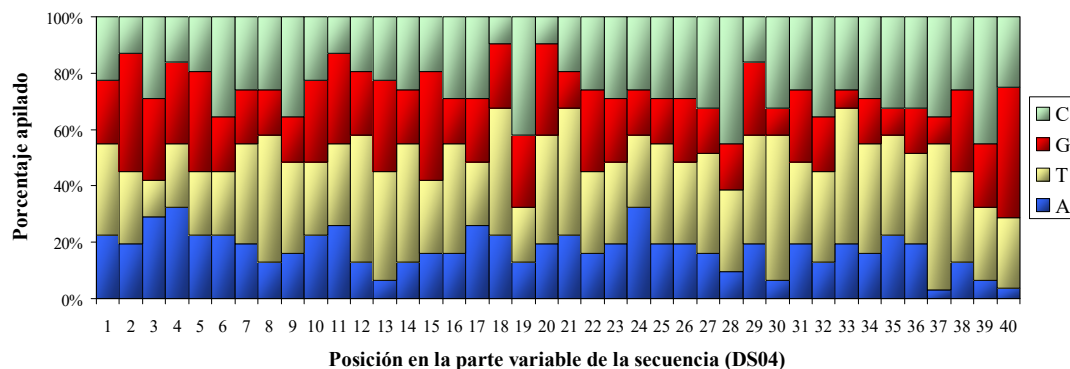


Figura A4. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 4 de la selección de aptámeros de DNA (DS04).

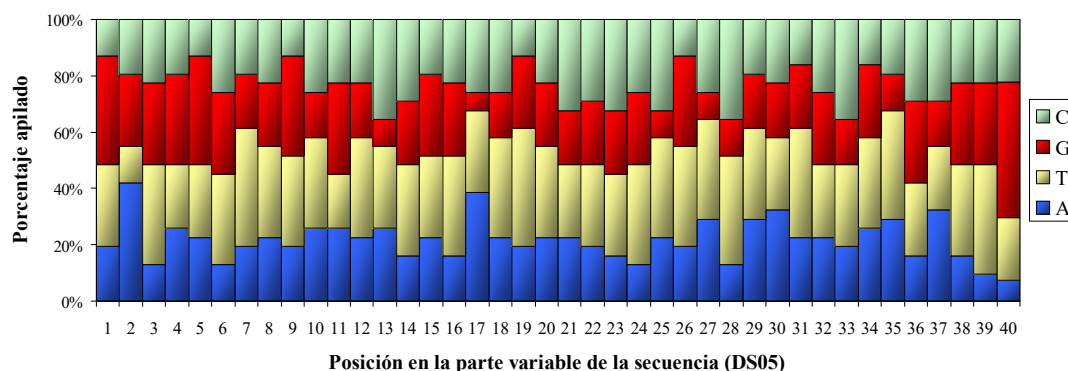


Figura A5. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 5 de la selección de aptámeros de DNA (DS05).

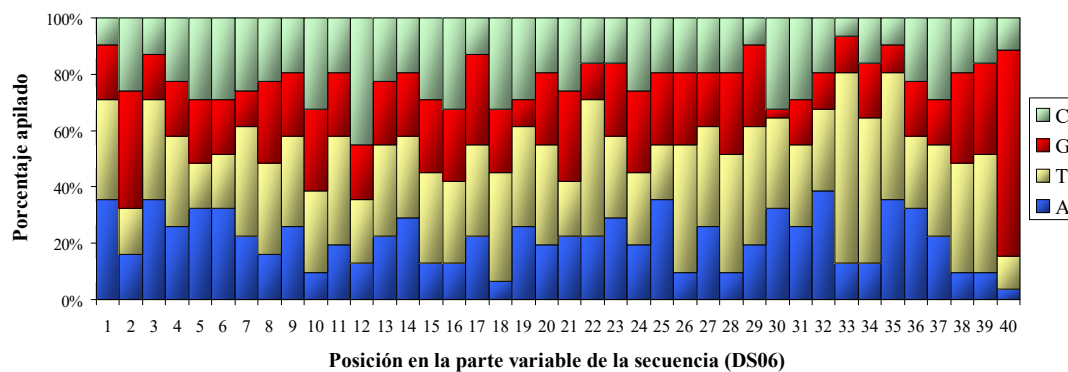


Figura A6. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 6 de la selección de aptámeros de DNA (DS06).

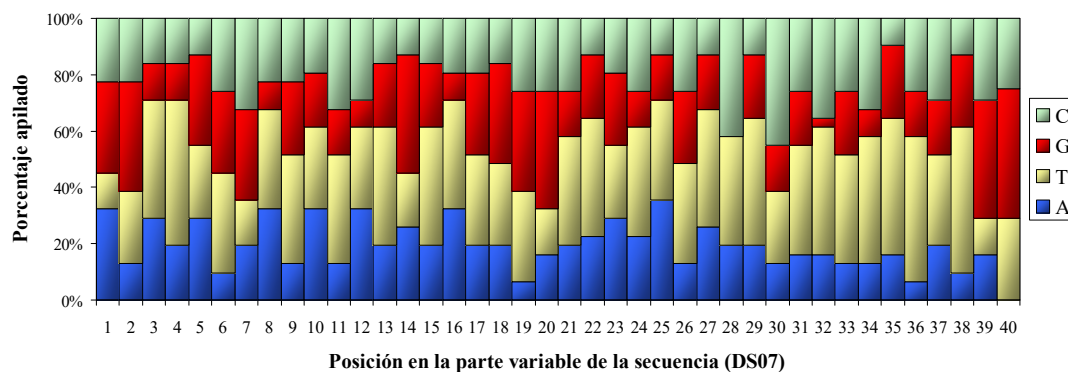


Figura A7. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 7 de la selección de aptámeros de DNA (DS07).

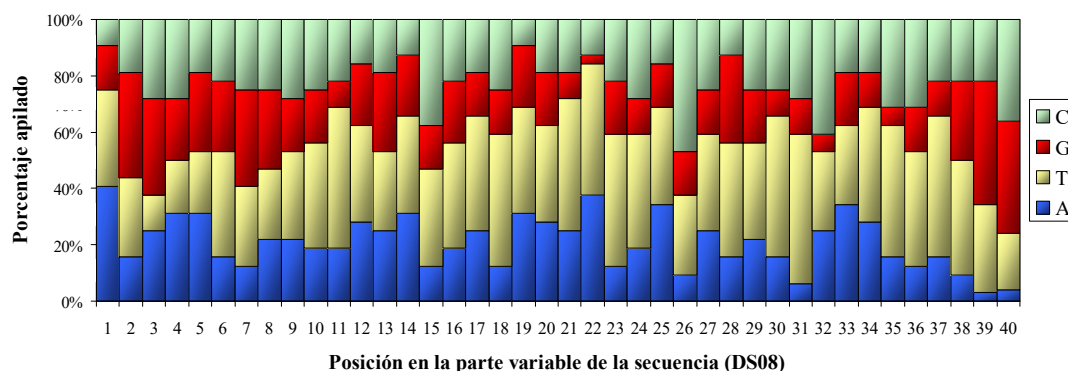


Figura A8. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 8 de la selección de aptámeros de DNA (DS08).

Tabla A2. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs de la población combinatorial inicial (00RINI) y de cada ronda (RS01 – RS08) del proceso de RS. El alineamiento no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. Los dos números finales del nombre de la secuencia hacen referencia al número concreto del aptámero individual clonado.

Nombre	Secuencia 5'-3'
00RINI01	-----UAAUCCAGAACUAGCCCCUCCGCCUCACUUAUGAUGUGU-----
RS0130	-----CAUCCUACGCUCGCGUAUAACAUGAGGUGUGCGUCUUGCA-----
RS0812	-----GCAUAAUUGGUUUUAUCAUGUGUGCGUCGUAGCUAGGUGGG-----
RS0820	-----GCAUAAUUGGUUUUAUCAUGUGUGCGUCGUAGCUAGGUGGG-----
00RINI33	-----CGCAUUUCA--CAUGAUUU-UGCGUUGUGGUACGGUGUUGUCG-----
RS0303	-----UGGUUGUGUCUACCUACGCGCGGAUCGCGGAUCACUGUC-----
RS0616	-----UAUCUUACCGUUUCCUUGGAGCUGGUCCAGGAACCUGUG-----
RS0310	-----UAUGUUAUCUCAUUCUUCGCGCGU-CGCAUAAUUGCUGUG-----
RS0819	-----UGUUCUCGUUUUUAUCUGGUU-UCGAUGAUUAUUUGUGGG-----
RS0123	-----CGCGUGGCGCGGAAUAUGACCGUCUUGUAACGAUGUUAG-----
RS0415	-----UCGUUGGGUGUAGUAUCAUCCGUUUGAUUCGCGGAUGU-----
00RINI38	-----CGACGUGUACGAGUAGCGCGUUAGAUCAGGUUAACACUUU-----
RS0814	-----GUUUCUGUGUUUUAGCGUUGGCUGU-GUUUCCUCCGUGG-----

8. APÉNDICES

RS0817	-----GUUUCUGUGUUUUAGCGUUGGCUGU-GUUUCCUUCUGUG-----
RS0207	-----GUUUUCUGUUCAUGCGCGGUAGAUGUUGUUAACUUUUACC-----
RS0512	-----CUUUCGAGCUACGCGCUGCGCCUAGCUUUCUUCUGUG-----
RS0815	-----UUAGUUGUUUUUUCGUGUGUGCUAGGCCACAUCUCUCCG-----
00RINI09	-----UUGGUCAUGCUGGAGCAGCUAUGCU-CGAGCAGUGCGGUCG-----
RS0609	-----GCUUUCGGGAGUUGGGCU-CGUACAGUUUGGUUUCUUG-----
RS0131	-----GUGC-UACCAGCAUGGCUCGAUUUCUUGUGGUGCCCUGACC-----
RS0606	-----UAGCACAUCCACCAAGUACCGAUG-CGUGAGGUGCUCUCG-----
00RINI27	-----GUAUCCUAGGUAGAGAGCGAGAAGGGAGCUCGCUUGGUUC-----
RS0203	-----CUGAGUUUAGAGCGGGCCGAGAUUUCGACUGCUGCCGU-----
RS0118	-----CUUGCCGAUUCUUGGACGCUAGGCGCACAUGUGUUGUC-----
RS0524	-----CGAGAGAUUUGCUUGUAUCCAGGUACAGAUGUGCUGGUG-----
RS0218	-----GUCCAUGUCGGGUGUGUGUAGCUGUUUUCUCUUGUUC-----
RS0321	-----AUUGGUAUCCGCCAGCCGGGUGGCCGUCU-UGUGGCUUUG-----
RS0636	-----GCUGUUUAGACCGCUUGUUCCAGGUACGCGUCUGCCGG-----
RS0523	-----UGCGACGUUCUAGAUCUCGUCUGCGUUGUUUCCUAGGUG-----
RS0722	-----AGUAGCAAUCGUUGCGCAGUUGUCUCAGAUUCGGUUCUG-----
RS0122	-----AAUAGUUGUGGUUCCGUGUCUUGGGAAGUUAACUCAG-----
00RINI02	-----GACUGAUGAGCCGGUGUGUUGUGAUUUGGUUUUAUAGU-----
RS0305	-----CUCUGUGCAGGCCCGGUUGGAAAGAAUUAACUCCCGCG-----
RS0206	-----AGAGCUCAUCCUCUGCGGCAUGGUUCUAUAU---GGAUUUGUG-----
RS0522	-----UCAGCCUUUAGGGGUGGUUGUGUAUUCUGGUUUUGGUG-----
00RINI06	-----UAAUGGGUGGAAAUGGUUUUCCUUGGUUGUUUGUGCUCU-----
RS0205	-----UCCCAGCUAUGCUUUUUCGGG-GAUUGAGGUCUGUUG-----
00RINI14	-----CCGUGUGUGGGCGUGGUUAUUGAAUUCGAGA---UAAUGGCUU-----
00RINI30	-----CCGUGUGUGGGCGUGGUUAUUGAAUUCGAGA---UAAUGGCUU-----
RS0705	-----GCUACCGUGGGCGCUUUUGCGGGAUUGAUGAGUUUAUGG-----
RS0703	-----UCCGCCUUGUC-UUCUGGGGUCAUUGAAGAGUCGUGUUG-----
RS0712	-----UCCGCCUUGUC-UUCUGGGGUCAUUGAAGAGUCGUGUUG-----
RS0704	-----UCCGCCUUGGC-UUCUGGGGUCAUUGAAGACCGAAUUUG-----

8. APÉNDICES

00RINI10	-----UCACGGUGAUUGUCGUGCUCAUUUUAUUCUUUGGCUAGCU-----
RS0614	-----GCGGUG-UUGCCGUGGUCAUUUGCAUUCUUAUUACAUUG-----
RS0611	-----CGGCAGCGCGGUUGCCGUGUCCGUUUUCCCUUUUUCUG-----
RS0716	-----CAUCGAAUGUGUCGUUGUUUGACUUUCAGCAGUACCCGUG-----
RS0717	-----CAUCGAAUGUGUCGUUGUUUGACUUUCAGCAGUACCCGUG-----
RS0308	-----AAUACUCAUCUAAAUUGCCGUU-CUCGAGUUU--GCAGUCUCC-----
RS0102	-----CUGACACGUUUGU--CUGCCGCUAGUGUGUGCGGUACCUUAUG-----
RS0220	-----CUCUGGCGGUCCUGGG-UUAGAACACGUAUGCUACUGUGCC-----
RS0211	-----UGCACGUUUCUGGCUCUGCCGAGUCGGGGUAAAAGUCGGG-----
RS0223	-----UGCACGUUUCUGGCUCUGCCGAGUCGGGGUAAAAGUCGGG-----
RS0428	-----CACAUGUUCUAGGUCUGUAUGGACCUGGUGGAAGUUGUG-----
RS0112	-----CUUAUACCAUCGUU---UCUAUUUCUGUGUAACGGGUGUCCUG-----
RS0422	-----GAGUAUCCCUUUGUUGGGUCUGUUUCUGCGGACGUUGUGG-----
RS0421	-----CGAACAAGCCUAUGUCAUGCUUCCCCUCUGUUGCCGGG-----
RS0726	-----GUGCGAAAACCGUUGUUUAGCUGAUUCCGUCUUUGUGG-----
RS0306	-----GGAAUGCUGCUUUUCUUUUACGUCGCUACGAUUGCGUG-----
RS0721	-----AGAUCUUUGACAGUUGCGAGGA-GUUAGUGUGUCUACCUCG-----
RS0326	-----UGU-CUUUGUGUGUUCGUGGGUUACUCGAGCGGUGUAUG-----
RS0334	-----UGU-CUUUGUGUGUUCGUGGGUUACUCGAGCGGUGUAUG-----
RS0615	-----AUGCGCUGUAUCUGUUUUAUGUGC-ACUCUAGCG-UGUUUGG-----
00RINI04	-----UCAAAUGCAAUCAUGCUGGGACCGAGGUGUUUGCUAUUU-----
RS0509	-----GUUAUGCGAGUAUGAUAAGAC--GUUGUGAUGGCUCUUUGU-----
RS0107	-----CGGGGCGCGGGGACUUGUCGUGGUUGCUUUUUAUGCUCG-----
RS0314	-----CGCUCACUACUUGACCGUGAU--CUUUUUGUCUGUGUUGGG
RS0510	-----UGUAAUUGUGUUCGUCUUAGGUUUG-UGUUAGUGUGGCCG-----
RS0708	-----AUCGGAAAUGUGGCUCGCUUCGGUUUGCUCUUUGUGUUG-----
RS0302	-----UGACGAGAUGUGUGAUCUACUUGCUGUUUGUAAUACUUUG-----
00RINI29	-----GCGGGCUGACUAGAUGAGGACAUAUUCUCCUGUAUCCUU-----
RS0219	-----UGCCGGCUGUCC---UUGCGGUGGGAUUCUGUUGCGUGCUUA-----
00RINI39	-----UGCUUU-UGU-UGAUCAAGCUGGCCUGCAUGUGGAUUGUUA-----

8. APÉNDICES

RS0806	-----CGGCGUUC--AAUGUGAACAAGUUUUUCUGUA--GCGUAUUGG-----
RS0517	-----CGGGGUUGCAGUAC--UGGUCAGCUUUCGACAAGACGGUGG-----
RS0518	-----CGGGGUUGCAGUAC--UGGUCAGCUUUCGACAAGACGGUGG-----
00RINI32	-----AAGGUUUAGUUCUAUUUACAUGAUGGGUUUUCUUUCGUG-----
RS0116	-----GUAGGUCGUAUCUA--GAUAAGUCUACUAGACUGUGUUUA-----
RS0121	-----GAUACCUUACCGGCGG--AUCAGGCAUGCUUGAUUGUGUUCU-----
00RINI31	-----GUGAACCAGCUGAAAUGGGGUGCCGGCGCAGGAUGGCUU-----
RS0108	-----GGUCUGCCGGCGUGCCCCGGGUGUGGUUAUUGCAACAGUC-----
RS0215	-----CCAGCUAAUUAACGUGGGUCCCCUGCGC--UGGAGUUGGUGG-----
RS0701	-----UAUUGCGCCACUGCGCCUGGAUUUUGUAAUAUUUGUGCG-----
RS0706	-----UUAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCG--UCGGUUUGUUG-----
RS0707	-----UUAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCG--UCGGUUUGUUG-----
RS0710	-----UUAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCG--UCGGUUUGUUG-----
RS0521	-----UAAUUUGUUCAAAGUAUCGGGUCCGGUGGCCUCCCUUUUG-----
RS0214	-----AAUUGGGCCCUGGGCAAGGCUGCGUUUAUUGCUUGCUUU-----
RS0109	-----UACGCGUACCUACAAGAGUGGUUGUGAUGUGUCCUUUGC-----
RS0640	-----GUGUAGAGAGUAACUGCCAGUGGUUGUGGUUUUGUUGUGUG-----
RS0312	-----ACGCAAGAUCCCGAAACAAGAUCAACUAGUGUUUCCGACG-----
RS0111	-----UCCGGGACCAGUGCGUGGGCCUGGCGCGUACAUAACUAGG-----
RS0424	-----AGUGUCCUGAGUCGUACACAGG--UGGUG--GUUUGUCCACUG-----
RS0228	-----GGUAUUAAGCCGUGGGAGCAACUAACAAGGCGGUCCGUGU-----
RS0426	-----ACUGUACCGUAAAACUUGGGUG--AUCUAACA--GUGGUGGG-----
RS0804	-----GCGC--ACACCUUGAUAGUGUUUAGAGGAGUGAUCACGGUGG-----
RS0810	-----GCGC--ACACCUUGAUAGUGUUUAGAGGAGUGAUCACGGUGG-----
RS0503	-----UCUUUAACAUGGCAUUAUUUCGUUGGAGUUAUCUUUGUGG-----
RS0526	-----UCUUUAACAUGGCAUUAUUUCGUUGGAGUUAUCUUUGUGG-----
00RINI41	-----GAACGGUCUUUCGUAUCACCUAAUUCUGGUUGGGGGGCCA-----
RS0623	-----GUGAUUCAAAUGAAAAAAUUCAGUUAGGGUCUCUCGCGCG-----
RS0634	-----GUGAUUCAAAUGAAAAAAUUCAGUUAGGGUCUCUCGCGCG-----
00RINI36	-----CGACUUAACUAGAAGUCAUUCGGCUGGGGGAUACCUUCUG-----

8. APÉNDICES

RS0429	-----GCGGUGUCUUAUCUG-GUGACGAUAUCAUUCUCCGCUCUUG-----
RS0825	-----UGAAAUAUUUGGUUGUGUUCUGAUGCUCCUCCUGCGCG-----
RS0307	-----CUAAGAUCGGCUUGCC-UCUUGCUCUCUAAUCUCCGUCACCC---
RS0418	-----GCAUGUAAGAUAGGUUUCCAAUGUUGCUGUCCGUCUCCG-----
RS0829	-----UCCAUGGUGUAAAAUUGAUUUGAU-GGUUCCUCUCGGUCG-----
RS0824	-----GUUAGUGAAGAAAAAAUUGGCGUUGAUUCCUUCUGCUGCC-----
00RINI42	-----GAUAUUUAU--AUUGCUGGAGAUCAUAC-UCGUUAUCGUAU-----
RS0230	-----AUGUUAUAUUUAUUGGGUG-GAUCGGUCCACCCUUCUGUG-----
RS0213	-----GCGUCCGGUGUAUU-UUGAUGGAUGUUCGAUCGUGCUCCGU-----
RS0315	-----GCGCGCCUGUCCGGGUGUUAUUUAUUCAU-UGCGAUGUUG-----
RS0412	-----GGUCCGUUUAGUUAUGAUGAUCG-CUGGCUAUUCUUCUUGU-----
RS0617	-----GUUUAGGAGUGAUGGAUGUCUGGUUCCUCGUGCUCUAUUG-----
RS0216	-----UUGGGUGUAUAUUUGAGGACUGAGGUUUUUUGUUGCUGC-----
RS0229	-----UCUUGCACCCGC---UGGUUUCUGUGUCUUAUUC--AUUGGCG-----
RS0404	-----UCUGCACCCACGUCCUGAUGUAUCCUGAGUUUAU----GUUGGG-----
RS0602	-----AAACCUUGUUUCUGGCGCCCGCCGGAUCUUUUUUGAGUGG-----
RS0604	-----AAACCUUGUUUCUGGCGCCCGCCGGAUCUUUUUUGAGUGG-----
RS0618	-----AUCUUUGACGCUGG-AUUCGCGCGGCCUGAUUAUUGUUGGUG-----
00RINI19	-----UCUAUGUGUCUACAUUUCGUCCAGCGGGUUGAGGCGGUU-----
RS0501	-----UCAAGUCCUCUGAAUCAGC-GGUGAGGCAGGUUGCUUUGG-----
RS0113	-----UUGUUAGGCCUAUGAAUUCUUCGUGGCUACUAUAGUCCCU-----
RS0727	-----UGUGGGCAUCCGCGUGAGG-CAUAAGGAAAACUUCAGUCG-----
RS0209	-----ACGACCGGUCGGACUAUCAUAUUGGUUAUGUCCUCCUGUG-----
RS0331	-----CGGACGGGAGGGAAGCAUUUAGGUUAUGUGUUAUCUUGUG-----
RS0514	-----ACGUCCAGCGCGGGGGACACUAAGCUAUACAUUGUUCU-UG-----
RS0520	-----ACGUCCAGCGCGGGGGACACUAAGCUAUACAUUGUUCU-UG-----
00RINI25	-----GUAUCCGUAUCAUGAUUCGAUC-GUUGCCGGUUAAGCGUU-----
RS0212	-----GUCCUCGACUCCGAUCCGUCGGGGGAUAAGUGGUUGUGUA-----
00RINI22	-----CUUAUAUAUCGUGGCAUGAGAGGAACGAGUGCAGCAAUCG-----
RS0311	-----UGCAGCCUUAUCUCGCUUAUUCGGUUCUUUUGCGUGUGG-----

8. APÉNDICES

RS0525	-----UAAUAUGUAGGUUGACCUCG-UGCAUACGAUGAUCUUGUG-----
RS0103	-----GCCAAACAUUGUCU---UUCGUAGCCUUGCGAAA--AU-CUUUGUU-----
RS0309	-----UAAUAGUCGUCUCCGUCCAAAACCUUAUACUC--AUACCUUG-----
RS0507	-----UGUUAUUAAGUCGCGUUAUUUUUUGUUU-CUAGUGUUGGUG-----
RS0515	-----UGUUAUUAAGUCGCGUUAUUUUUUGUUU-CUAGUGUUGGUG-----
RS0714	-----UUAUUGUUAAG----GUGAUUGUCCGUUAGCCUGUUUUGGUCG-----
RS0715	-----UUAUUGUUAAG----GUGAUUGUCCGUUAGCCUGUUUUGGUCG-----
RS0718	-----UUAUUGUUAAG----GUGAUUGUCCGUUAGCCUGUUUUGGUCG-----
RS0613	-----GUUUGUACCGUCACCUAUCCUUAUUUCCGUUA----CUGUUGG-----
RS0322	-----UACUCUUUGAAUAAUUUAUGGAUGUUGUGCUAUUGAUGG-----
RS0324	-----UACUCUUUGAAUAAUUUAUGGAUGUUGUGCUAUUGAUGG-----
RS0328	-----UACUCUUUGAAUAAUUUAUGGAUGUUGUGCUAUUGAUGG-----
00RINI23	-----GUCGACCUAACUUUA-AGCUGUUGU-CUAUAAAUAUACCUCG-----
RS0622	-----UUAACUCAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCC-----
RS0635	-----UUAACUCAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCC-----
RS0639	-----UUAACUCAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCC-----
RS0318	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0319	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0320	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0323	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0325	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0327	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0408	UCACGUUUGUAUUGUGUGUCAAUAGCUGACGCGUUUGU-----
00RINI34	-----UAUUGUAUUUUAAGAUUUUCGAAUCCGAGUUUGUGCUAUU-----
00RINI35	-----GUCUCACUUCUUAUC--UACUC-GG--UCAUGCUGUUGGACAGUG-----
RS0630	-----AUCCCGAUCUACUUGUAAACGGUAUUCUGG--ACAUCCUGG-----
RS0317	-----UCUUUCUUAGCAUUCAUUUUUGGGCACGUGUUGCUAGG-----
RS0333	-----UCUUUCUUAGCAUUCAUUUUUGGGCACGUGUUGCUAGG-----
RS0828	-----GCAAGUUCUUUUAAACAAUCGUAAUAUGG---UGCACCACCG-----
RS0830	-----GCAAGUUCUUUUAAACAAUCGUAAUAUGG---UGCACCACCG-----

8. APÉNDICES

00RINI12	-----UCUGCAAUGGAAGUACGCGCCUCACCGAUUCUGUCAAU-----
00RINI26	-----UCUGCAAUGGAAGUACGCGCCUCACCGAUUCUGUCAAU-----
RS0117	-----UAAACGCACUCUUUGUUGAAGCAAUAGCGUCCCGGUUUC-----
RS0332	-----GACCCCGCACUCGGCUUUGUUAACGUAUUUGUAUUUAG-----
RS0809	-----AUGAGGUCCGUGUUUGUUAAGUUGUAUGGAUUUCUCUGG-----
RS0401	-----CCUAAUAUAGUGUUUGCAAGCGCCUUUGCAUGGAUAUGGG-----
RS0502	-----AGUUCUUUUUCAGUGCUGUCAAG--UUCUCGCGUUUGCUUGG-----
00RINI16	-----CUGCGCCGGAUAUUUC--CUAGUUAGUUUUGCGUAUUGACC-----
RS0425	-----GGCGUGCACCAUAAUGGUUU--UCGGUCCGGUUGCCGUGUUG-----
00RINI18	-----UCACGCGCAGUUUUUCUCAUAGGUA-CGUGGCGUCUGAGAG-----
RS0114	-----CCCGCCGUAGUUUAUC-CACGGAUAUCUUGCCGACUGCCGG-----
RS0217	-----UGUGGCUUCUAGAGAAAUUUUUUCGUUGGGCACCGCUCUG-----
RS0427	-----GUAAGGUGAUGAUUCUGUAUAAUACUUACUGUUGCGCCC-----
RS0221	-----CGUCAGCGUCAAUUUUCACUCUUAUUGUUUGCUCGGUG-----
RS0619	-----UCGUGAGGUUUCUGGAUGACAUUGUGU-CUGGGUGUAGUG-----
RS0104	-----UAAAAUGGGUAAUGGUAAUGAUGCAUGCUGCAUGCCCC-----
RS0601	-----UUUUCGUGUGGUAUCGUCAGGAU--UGCGCGGCUGCUUUUCG-----
RS0419	-----UCACGUAUGUAUGGUCGAU-U-GGGCAUUCUUCUUUCUUGC-----
RS0638	-----UGACGC--UGUAUAGUGGCUCU-GAGUAUGAACUUCUCUCUG-----
RS0201	-----AAGUGUCUGCCGGUAGCGU-UACC--GUCAUAUGUCCUACG-----
RS0720	-----UCCUGUGUAUUGGUUAGGU-CUCCU-CGUCUUCAGUCUU-CG-----
RS0637	-----GUUGCUGGUAUAGGAU-UCCGU-CCUUUUUAUAUUCUGGG-----
RS0641	-----GUUGCUGGUAUAGGCU-UCCGU-CCUUUCUAAUAUUCUGGG-----
RS0725	-----GGUCGGAGCAAAGU-UAGAU-UGUCGGGACAUGAGUCGCG-----
RS0827	-----CGUCCCGUCGUAGCUUAACGUUUAU-UGUUUCAUACGGUUG-----
00RINI07	-----GGCCCGUU--AACCGUUCGUAGUGAUAAGAUUGGUUAUGGUG-----
RS0105	-----AUCUGUCCCGUC--AGCUCUCUGUGCGCGUACGGUUGGGUAU-----
00RINI13	-----UCCCGAG--AGCCCUUCGUCCAGAU CGGUUAAGUGACUAGUU-----
00RINI24	-----UCCCGAG--AGCCCUUCGUCCAGAU CGGUUAAGUGACUAGUU-----
RS0805	-----UCCUACUCAGCCCAUAGU--GAUCUGGUGAAGUAAUUUGCG-----

8. APÉNDICES

RS0801	-----UCUGCGUGUCGGGUCUAAUGUUACACCGU--ACCUCUUUGG-----
RS0802	-----UCUGCGUGUCGGGUCUAAUGUUACACCGU--ACCUCUUUGG-----
RS0811	-----UCUGCGUGUCGGGUCUAAUGUUACACCGU--ACCUCUUUGG-----
RS0416	-----GUAUUAGAUUUCUGCGAUCCGGUUAAGUUACAUAGUGCG-----
RS0430	-----AAUUUAGCUCUAGGU-UGUUUAUGUGUGCUAACUG-GCGGG-----
RS0821	-----GCUUUAAUUCUAUGUACGUCUUAUCAGAGUGGUCUUUGCG-----
00RINI20	-----UACGUUAAUUC-AUGU--GUUAAUGUGGACUUAUCUGCGGAGG-----
RS0124	-----CUGCUCGGGCGCGUUUAGGUUCGUUUUAUACCGUGCAGUC-----
RS0612	-----AGUUGAUCGAGUG-GUCUGGGUA-AUCGUUGACCAUGCCGUG-----
RS0831	-----GCGGAGCGACGGCAGUCAAAUGACUGUU--CUGUGUAUUGG-----
RS0832	-----GCGGAGCGACGGCAGUCAAAUGACUGUU--CUGUGUAUUGG-----
RS0803	-----CUCCGAGUUGCGUUUGU--AACGCCUGUCAACGAUGAGUGCG-----
00RINI40	-----AGUCGCUUUUCUAACUAAGACCGGAAAUUCGUUUAUGGU-----
RS0711	-----UCAUCCAGACAGUCUCUAUGAU--GCUCAAUAAUCUCGGUUG-----
RS0329	-----UUACUGAGUAUUCUCCAGUGUACCCCCUCUAUUUC--UUG-----
RS0330	-----UUACUGAGUAUUCUCCAGUGUACCCCCUCUAUUUC--UUG-----
RS0413	-----GAGGGACUAAUACGUGCGGAUUCUUGAGAGUACCAUUG-----
RS0808	-----UUACCGUGAAAGUCGCUUAGUUAU-UAAU-GUUCCGCGUUGG-----
RS0816	-----UUACCGUGAAAGUCGCUUAGUUAU-UAAU-GUUCCGCGUUGG-----
RS0822	-----UUACCGUGAAAGUCGCUUAGUUAU-UAAU-GUUCCGCGUUGG-----
RS0101	-----GUGACUCUCGCGUGAUCAUACAUUGCGUUUCCUUCGCGU-----
RS0120	-----CUCCAGCUCGUUCUCUUCUCUUGUCCGACGCCGUUUCGGU-----
RS0316	-----UACGCGGCUCCACACUCCAGUUCCGUAUUUCUUCUGUCUG-----
RS0402	-----CAUAGGGCGAUGCAGGACAUUCGCCUAUUAGUUCGUUUG-----
RS0527	-----UAAAUAUCUCGCGUGGAGGCUAGGUCGCUUUACUUUGCC-----
RS0202	-----GACUUACAAGUCAAGCUCCU-AUU-UCUGUUCGAUAGUGGUG-----
RS0605	-----UGGUGUGGGGUCUCAGUCACUC-AUUAUGUGUACGAU-GUGG-----
RS0210	-----UCUGCAGCACUCACUUCAAUGUCUACCAAUAGUCACUGU-----
RS0621	-----UCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUAU-GUUCUUCG-----
RS0625	-----UCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUAU-GUUCUUCG-----

8. APÉNDICES

RS0626	-----UCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUUAU-GUUCUUCG-----
RS0224	-----CAAUCCAGGGUCCUCGACGCCACGUUAUUGUCGUCCGUGG-----
RS0608	-----UUCUUAUCGAUUG---GUCGGGGUCGCCCCGAUGU---CUCCCGUG-----
RS0633	-----UCUACUCAAUUGAGGGUCGGGGUGGUCUUGUUUC---CCUGCG-----
RS0226	-----GCGGCCUUAUUAUUUGGUACAUCCACGUCGUGUUUGUUG-----
RS0420	-----ACCGCCGUAUAGCCAGGUAGGCAUCCUCGGGUUUUUUUG-----
RS0411	-----AUUCUCACUGUCGACUACAUAUAC-UGCCGUGUCCACAGGUG-----
RS0301	-----GACAUUAGCUUGAUUCGCGAUUCGGUGCCUUAACCACGUG-----
RS0728	-----AUAUGCAAGGAACGUCAUCCGGUUAAGUUA-UCGCACGGCCG---
00RINI08	-----UUACGUUUAGGCUUCGAGACACUAACGGUUAUCAGUAUC-----
RS0106	-----UCUCUUCAGAAUAAA--UCAAGGUUAUUAUUCUAUGCAGU-----
RS0506	-----CGAGACAGC---UAAAAUCGUAAUUGUCCCCUGCGUGCCGUCC-----
RS0508	-----CGAGACAGC---UAAAAUCGUAAUUGUCCCCUGCGUGCCGUCC-----
RS0511	-----CGAGACAGC---UAAAAUCGUAAUUGUCCCCUGCGUGCCGUCC-----
RS0513	-----CGAGACAGC---UAAAAUCGUAAUUGUCCCCUGCGUGCCGUCC-----
RS0119	-AUCUGUUAUUGUUCGAAGCUGG---UUAACCGCACUCUUUUG-----
RS0826	-----UGUGUUCGACGGUGA---U--AAUUGGAAUUUUUUGACUUCUUGG-----
RS0129	-----GGGGUCCUCGCUCUGAAGCGCU--CAUGAUCUUUA-AUUGCU-----
RS0813	-----CCACGUUCAUAAGUCCUAACAUGAUGUCCCCACUACCUGG-----
RS0417	-----UUGUCCUAUAUGACG--AAACGCUCCAUCUUACGUGGUACG-----
RS0631	-----UUGAGGGACUUUAACACU--UAAUCUUUCAGUCCUACCUGAG-----
RS0227	-----AAAGUGCUCAGCGGUAUCUCAAGCUUGGAGCCACACGUCC-----
RS0528	-----UACUUCGAGCUUAAAGGCCGACGCUGAACCUCCGACUGG-----
RS0620	-----UGUGGCAUAGACCUAUUUCCGCGGAAC-UGUGUAACCCGGG-----
RS0624	-----UGUGGCAUAGACCUAUUUCCGCGGAAC-UGUGUAACCCGGG-----
RS0627	-----UGUGGCAUAGACCUAUUUCCGCGGAAC-UGUGUAACCCGGG-----
RS0628	-----UGUGGCAUAGACCUAUUUCCGCGGAAC-UGUGUAACCCGGG-----
RS0629	-----UGUGGCAUAGACCUAUUUCCGCGGAAC-UGUGUAACCCGGG-----
RS0632	-----UGUGGCAUAGACCUAUUUCCGCGGAAC-UGUGUAACCCGGG-----
RS0519	-----GACGUUCAGGGCACAGACUUAACCCC-UGGAAC-UGUGGGUG-----

8. APÉNDICES

00RINI1	-----UUACUGUACCUAAGACGGUGCGCCUCUUCGUAUGGAUCCC-----
RS0607	AAAACGGUCUUCUGUAGUUUAGUACGUGCUGCUCUGCCC-----
00RINI28	-----GUGUUAUGAAAUAUAGGCGUCUCGUAACUAGA--CGUUUA-----
RS0713	-----GCCAUUAUAGGAGG-UCGUGAUCACAACCGUUUACAUUGCG-----
RS0702	-----CAGUUCUGCAAUUAUUGGACG-UAGCGUUGAUUCCCGUCG-----
RS0709	-----CAGUUCUGCAAUUAUUGGACG-UAGCGUUGAUUCCCGUCG-----
RS0335	-----GGUGUCUCGUUCUUAUUGUACCUUCCCUUGCCGAUCCUG-----
RS0336	-----GGUGUCUCGUUCUUAUUGUACCUUCCCUUGCCGAUCCUG-----
RS0807	-----UGUUCAUUAUUGCAUGCAUCUCUCCAAUCUCUCCUGGG-----
RS0414	-----GCAGAAUUGGGCUCUUCGUUAUUCGGUGUAUAUUGGG-----
RS0724	-----AAAACUCCCAUGGGUCUUGGUACUUGCU-UACCUUCGGGG-----
RS0204	-----GUGCUAUAUCUCCCCU-AGGUUU-AGAGACUUUAUUUUG-----
RS0231	-----GCUUGCUGUCCCCUUAGGCUUU-UAUGAACGUUAUGUGG-----
RS0818	-----AACAGCUUCCCGCUUCGGUAUUCAGAGUAUUUCAGUUCG-----
RS0208	-----CGCUACACUGUCGUUGUGGCUUAUCUA-AUUCGCUGGUGG-----
RS0410	---GAGCACGGCUACAAUCUUCGGGUUUGCUACUAGAAUCG-----
RS0405	-----UGCAUUUUUAU--CGUUCACUCUUGGUUCUU-UACGUCUUGGUG-----
RS0406	-----UGCAUUUUUAU--CGUUCACUCUUGGUUCUU-UACGUCUUGGUG-----
RS0403	-----UG-AUUUUUAGACGCCCGCUUCAUGGUUGU-UUCAAUUGGCU-----
RS0603	-----UUUGUGGGCUUUUGAUGUGCCCCUCUAGCUGUUGUUCG-----
RS0610	-----UUUGUGGGCUUUUGAUGUGCCCCUCUAGCUGUUGUUCG-----
00RINI03	---CCUAUCAACCGUCUUCACUGGAUUGAGAAGGGUUUUUCG-----
00RINI37	-----AUGAUUGCUUCAUUGAACUAGUAACGGUUUAUGGAUCGGU-----
RS0504	-----UAUUUUGAUCUUCUAAGUCGCC--CCUCCCCUAACCCUUGC-----
RS0505	-----UAUUUUGAUCUUCUAAGUCGCC--CCUCCCCUAACCCUUGC-----
RS0516	-----UAUUUUGAUCUUCUAAGUCGCC--CCUCCCCUAACCCUUGC-----
00RINI17	-----CCGGCAUGAUCGUACAUCUUUUUGGUCCUCUCAUCACC-----
RS0723	-----UGCCGGUGUUUCCUGCAGCGUUAGGUUGCUAUUCUCUGG-----
RS0729	-----GUUUUAUCCUG-AACUUUUUACCGCCUAUCUCUGUCCGGGG-----
00RINI15	-----AUCUUAGUUGACAAUUCUU--CGCUUGCGGACUUCUGACGC-----

8. APÉNDICES

RS0225	-----AUUUAGGGGAAAAGUUUUGACGCUCCCGGAGUCACGAGCC-----
RS0127	-----GGCAAAUGUUUAAGUUGCGAGUCGUCGACUGUCGUAGGG-----
RS0409	-----UGGGGGCUACCAGUUGAAUAGUAGGUAGUAGUUCUCCUG----
RS0823	-----UUACGUUAUAAGCCAUCUGUCUCACUCGUAGGCUGUGGG-----
00RINI05	-----UUACCC-UUAUUCUCCCGGAU--UCUUCGCGCUUAGGUCCUGU-----
RS0126	-----GUUGCAGAUCAUCCUGCCGUUA--UUUCCGC-UUUGAGACCUG-----
RS0719	-----UGACUAAAAAGAUGCUGAACA--CCUGUCCCUUUAUGUGG-----
RS0128	-----AAUGAGUUUGGUCACC--UCGG-GCCGUCGUAUCCUGCCUAU-----
RS0407	-----UGCUAUAUGACUCCUGCAUC--UCCAUGCCCGCGUAUCUGG-----
RS0313	-----GACGAUGGCUCUCCGUAGUCG--GCUUUGCCC-CUCAUCCUCCCC-----
RS0110	-----UGUGUCAGAUGGAU--UCGUC--CUGCCACCGCGCCUGUCUGU-----
RS0222	-----UGUUAGAUGCAUCGGUCCUC--CUUGCAGCAUAUCUGU-UGU-----
RS0304	-----UCAGCUAGCCAGAAGG-UCUUG--GCCGCAUGGUGUCUCUGG-----
RS0115	-----CUCGCCGUCAGUAAGGUUCA---UCUCGACCGUUUGCUUUUG-----
RS0125	-----AUCGGUCAGUCCUGUCCCCCUCUCUCCCAUUUCUUCUUG-----
RS0423	-----UCCGCGAGUCUGUCACCUUUU---UCCAGCCAGGAGCUUUGG-----
00RINI21	-----UUUCACAGUGCCUGUAUAUCGCUAUGCAAUCCCCCGCA-----
RS0431	-----GAGUGCUCUCCCAAACUAGUAUCUAUUGCAAGUUACGGUG-----

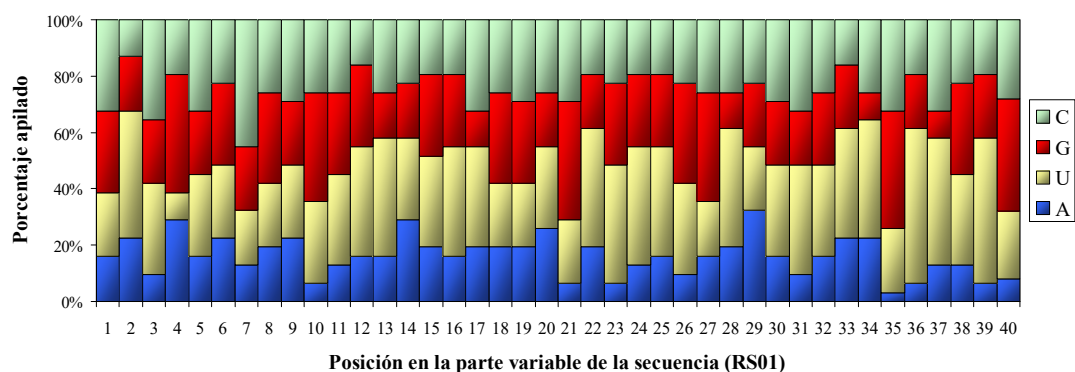


Figura A9. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 1 de la selección de aptámeros de RNA (RS01).

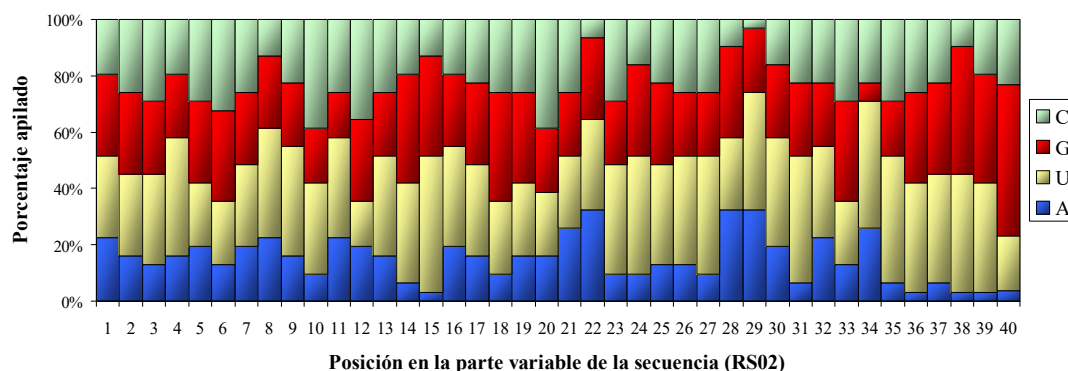


Figura A10. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 2 de la selección de aptámeros de RNA (RS02).

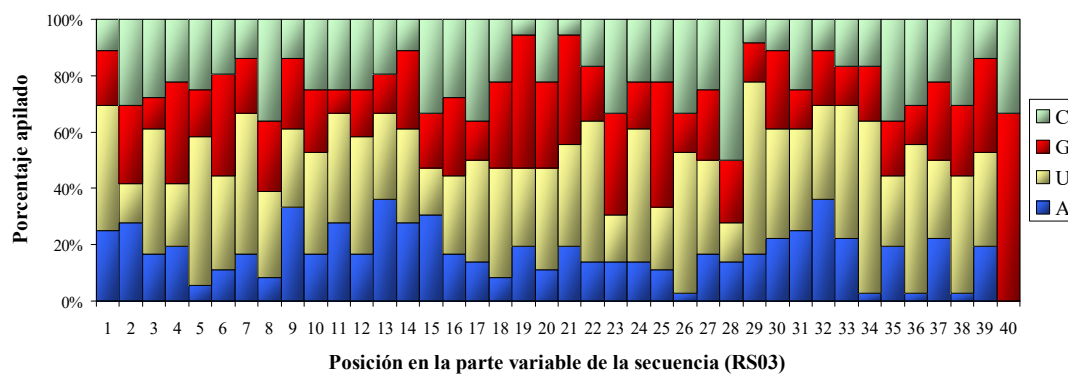


Figura A11. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 3 de la selección de aptámeros de RNA (RS03).

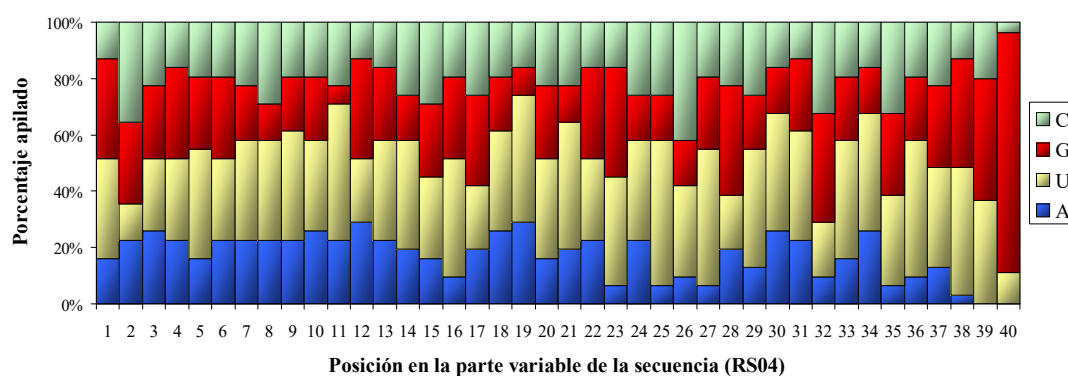


Figura A12. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 4 de la selección de aptámeros de RNA (RS04).

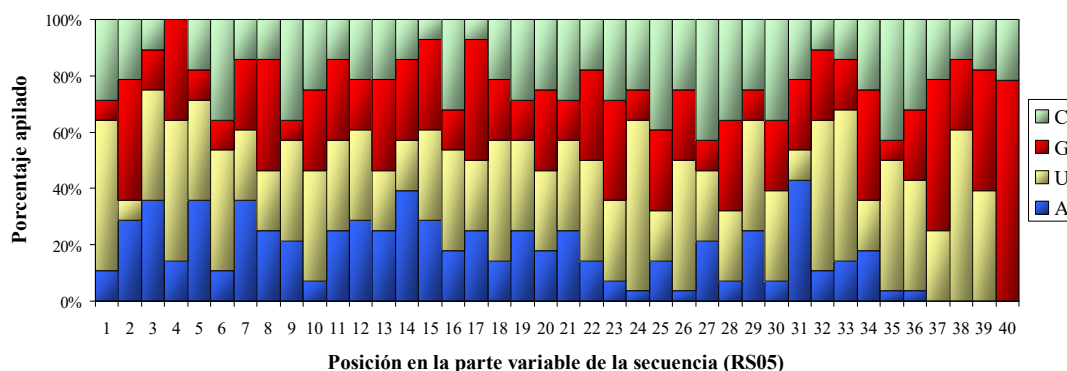


Figura A13. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 5 de la selección de aptámeros de RNA (RS05).

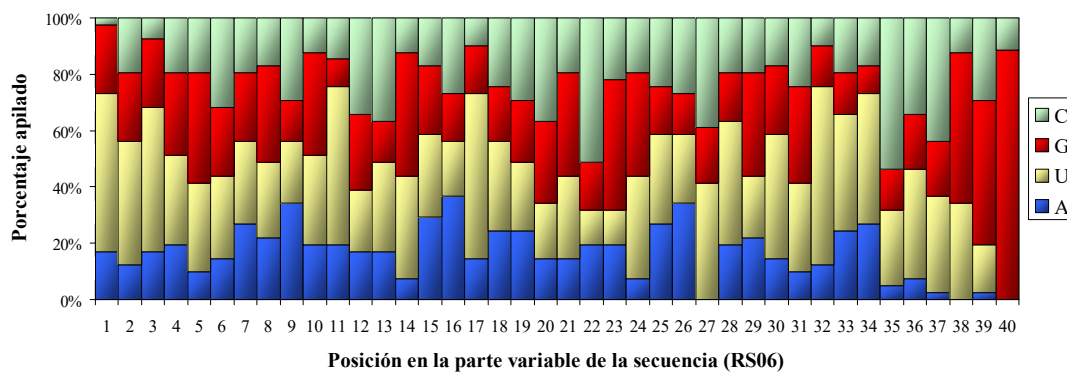


Figura A14. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 6 de la selección de aptámeros de RNA (RS06).

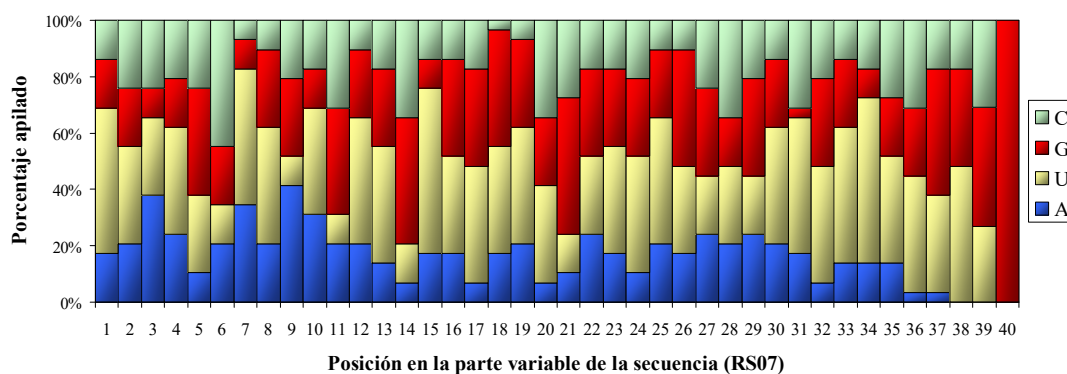


Figura A15. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 7 de la selección de aptámeros de RNA (RS07).

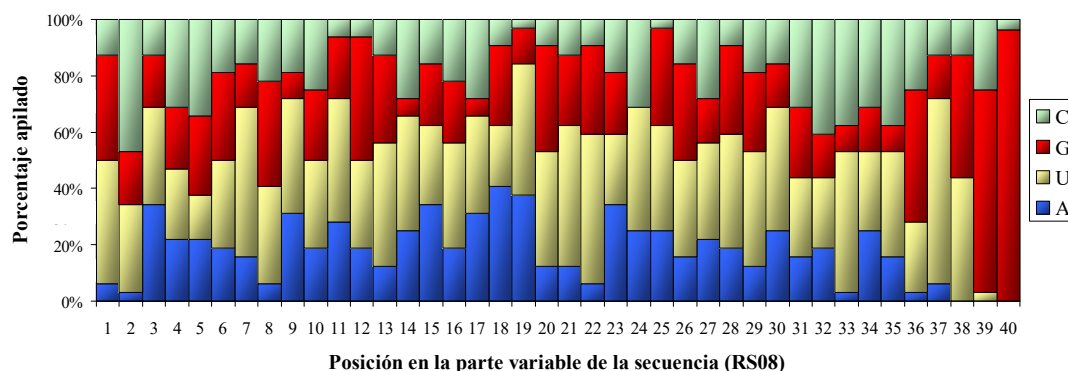


Figura A16. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 8 de la selección de aptámeros de RNA (RS08).

Tabla A3. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs de la población combinatorial inicial (00DINI) y de cada ronda (DE01 – DE08) del proceso de DE. El alineamiento no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. Los dos números finales del nombre de la secuencia hacen referencia al número concreto del aptámero individual clonado.

Nombre	Secuencia 5'-3'
00DINI02	-----GACTGATGAGCCGGTGTGTT-GTGATATGGTATTATTAGT-----
00DINI10	-----TCACGGTGA-TTGTCTGCTCATTTTATTCTTTGGCTAGCT-----
DE0420	-----GGCGGTTTTGTCTTGAGC--TTCATTGTGGTTTTTCTTAGC-----
DE0817	-----TGAGCTTTATTGTCTGAGCCATTATTGTGACTTTTCTC-----
DE0103	-----GCTAGCCAGCAGGTCCGCGCCGTTTGCTTATTTAATCTG-----
DE0306	-----GAGCAGAGGTTTCGCGTCGCCTTGTTATTTGTATTTTGA-----
DE0404	-----GGATGCAGAGGTTATCAGAATAGGCTTTTATGATTATTG-----
DE0814	-----ACAGAGTTGTCTAAGAATCGTCTGAATTTTATTTTGC-----
DE0226	-----GGCATGAATAGGCAGGTCATCTACGCTTTGGAATTATCA-----
DE0422	-----TAAGGGTTTTTGATTAGTCGGGGCCTGTTCTTTTTCGTGT-----
DE0604	-----TATCTTTCTATACTATTTCAGCAGTGCTTCCCTTGCCTTCA-----
DE0622	-----TATCTTTCTATACTATTTCAGCAGTGCTTCCCTTGCCTTCA-----
DE0112	-----GTCATTTATTTTAATTTTTTTTACGGTTCCAGTCCCTCC-----
DE0710	-----GATTTCTTATTATTCTGTATTTAATCTCGTTTCTGTATG-----
DE0730	-----TTTGTCTTAGTTACCCTATCTATTATATGCTATTCTTT-----
DE0302	-----TCAGGAATATGATTTCTTTGTTTCGTCGTTTT--ATTGCCGT-----
DE0629	-----ATATAAGTAAACCCACGAATACTGCACTTCCAATTTTCGT-----

8. APÉNDICES

DE0127	-----TGAAGTTATAAGATTGCTATATTCGTCCGCAGTTTCCGGA-----
DE0526	-----CCTGGTAGTTATGTAAATTGGT-TTCACCGTTGATTAACCG-----
DE0719	-----CATTTCGATTTACATAAAGCGTTATTCCCCGTTATTTAAGT-----
00DINI32	-----AAGGTTTAGTTCTATTTACATGATGGGTTTTCCTTTCGTG-----
DE0215	-----TAGAGGTAGTCTTTTTACGCTTTCACGTGTTGTGGTTTTT-----
DE0707	-----TAATGTTAATATGGCTACGGGTGATGTGCCTTCTACCTCG-----
DE0424	-----GTGATCTAGTTTAATCCAGGTGATCTGACCATTATCCG-----
DE0510	-----CAGGGTTTCAG---GGTCCAGA-GATCTGATTTTATACAGAGTT-----
DE0702	-----GTATACGTGGTATTTCGTTAGATGTGATGTGTTTATCTTGT-----
DE0808	-----ATAC-TGGTA--CATTCCATGCGGTTGTTTGACCTATAGACA-----
00DINI06	----TAATGGGTGGAAATGGTATTTCCCTTG-GTTGTTTGTG-CTCT-----
DE0715	-----TTGGAGATGGTATCTATCTGAGTTTCTGGTG-ATCTCTCTT-----
DE0208	-----GACCGTTTTATTGGCATATCACTGAAA-GTCTC--TGCATTAC-----
DE0307	-----TACGGTATATTCCTAT-TCGCGTAAA-GTCCCCATGCATGTG-----
00DINI16	-----CTGCGCCGGAATATTTCTAGTTAGTTTTCGCTATTGACC-----
DE0614	-----TGTAATCATTCAACGTTACTTGTG-GTACTCACACTCTCGT-----
00DINI20	-----TACGTTAATTCATGTGTTAATGT-GGACTTATCTGCGGAGG-----
DE0705	-----TTCATTTACAATCCTTCATTTATTTTGTGGAGTTTCT-----
DE0801	-----GTTTCGTTTCC--ATTTCTTAGTCTGCTACTGTTATCTGCCT-----
DE0807	-----ATTTGTTTCCTCAATTCTAATTGTGCGACTGATCTTATGG-----
DE0527	-----GTCATATAACGCTAAGGTTTTCCAAGTTTTACAGTTTTTG-----
DE0825	-----CCCAGACAATGCTACGCTATTC---ATATTATAGTTTCCATGT-----
DE0406	-----TTTTGTGCCGCCGAAGGGTTTCT-CTTTGTACTGTCCCTAT-----
DE0408	-----TTTTGTGCCGCCGAAGGGTTTCT-CTTTGTACTGTCCCTAT-----
DE0429	-----GTTCTGCAGACTGAGCTTTCGACTTCGTAATTTTACACC-----
DE0511	-----AGGTTTCAGTTTCCCCTTGTGTTACCGTCCCTCCAGTTAGT-----
DE0512	-----AGGTTTCAGTTTCCCCTTGTGTTACCGTCCCTCCAGTTAGT-----
DE0625	-----TGACAGTTTATTTTCTAAGCGTACTCC--ACTTCATGTTACA-----
DE0818	-----TGTGTTGTTTCGTCTCCGT-----TTC-TCTTTTATACTTACGCTTT-----
DE0832	-----AATGGCACGCGGCGACTCCGC-----CACATGTTTGATTCTCAAG-----
DE0819	-----GAGGTGGTGCTTCCTCGA---AATGTCCTTTTTTATACTCGGGT-----
DE0824	-----GAGGTGGTGCTTCCTCGA---AATGTCCTTTTTTATACTCGGGT-----
DE0820	-----ATTTTCTCCGTAGTGTTTCCCTCGAGTAACGTCCGTTTT-----
00DINI05	-----TTACCCCTATTCTCCCGGATTCTTCGCGCTTAGGTCCTGT-----
DE0505	-----CTATTTTAGTCTAACTGGATGTTTCGTTATAATGACCTAG-----
00DINI17	-----CCGGCATGATCGTACATCTTTTTGGTCCTCTTCATCACC-----
DE0119	-----CTTTTCACACGTGGTCGTCCCGCTGGTTGCTCCGCAGTG-----
DE0203	-----GCAGTTACT-TTTGTGTGTTTAGCATTGGGAATAGTTCTGA-----
DE0619	-----TGCCTACC-GGTGTTTCATTTCGCTTCGTATATCTCTCTGTG-----
DE0319	-----TGCGGGTAGC-CGCTTTCGCCTT-CATATTATTTCTCCCGCG-----

8. APÉNDICES

DE0720	-----GCGTTTGGTTTCGTCTTCGCGTTGCATGTTCCCTCCCTG-----
DE0821	-----GTTAGTATTTTCGACTTAGTGCTCGTTCATGTTATTCTGCG-----
DE0823	-----GTTAGTATTTTCGACTTAGTGCTCGTTCATGTTATTCTGCG-----
DE0611	-CCCGGTGGTCGGTATTGCGACGT-GCTCTTGATCTCTCTA-----
DE0206	-----TTCAGTGCCTGTTCTGGCGCTGTGTAGCCCGTTTGACGCA-----
DE0803	-----GCCAGTGTTT-GTCTCCGTGTTCGCTTTGGACGGAATTGG-----
DE0320	-----TGGGGCCTCTGGTTCTCTCCGATCCGTTTGTTCCTATTGC-----
DE0701	-----GGGCATCATTAGCTCTTCTGTTTCTTTGTTTCCCTTTTGT-----
DE0225	-----ACCGAACCTTTGTTGATTGTA-CTCTGGTTCACTTTCGGGC-----
DE0727	-----TGGCTATGTGCGATTATATCTCTGCTACCTTTGCTTCCCGT-----
DE0327	-----CTCAATGCTGCCCTTCTCTGACGTACCTTTCTTCCGCGT-----
DE0728	-----AAATTAAAGC-GTCTCTCGCGGA-GGACCGCTTCTATCTCG-----
DE0101	-----CGTC-GAATATGGGTAAATTTTCT--CTGTCATATCCAGTCT-----
DE0316	-----TATGTGCGTA-GTACACGGCCAATTGTTCTATCTGTC-TATC-----
DE0102	-----AGGTCGTACGTCCTTAGTACATCATTTGTACATTACCTTG-----
DE0104	-----TTGGCGTATGTACATGGCAGAATCTTTCACCTTCTCCTTG-----
DE0713	-----ATCTAATTT-CCAGGTCTCTCCGAGTTATGTATTGGGGCT-----
DE0815	-----ATCCTATGT-CATGGCCTTC---AGTTCCGTATCGCTCTCGTTA-----
DE0209	-----TAGCCGTAAGT-CATGTCAGTCTTC--TGTATGTATTACGCGG-----
00DINI33	-----CGCATTTACATGATTTTGCG-TTGTGGTACGGTGTGTGCG-----
DE0616	-----TCAAAAGTTCCCATG-TTGCGCG-GTTGCTTTCAGTGTTTAT-----
DE0227	-----GCCCATTTTAGGCCGTG-TATTCTGTGTGTCTGCTCCC-----
DE0724	-----TGACTTCCATTCTA--TCATG-TTTCCTTATTCCGTTGTGACC-----
DE0118	-----TTGCAGCGGGT-TTGTGCGCA-TTCGATTACATTGTTCTTA-----
DE0530	-----CTTTCGATTGGGCATTGGCGTCC--TTATATTATCATGTTGCG-----
DE0323	-----TTGTGCTGTGGCATTTCG-TTCGCTCACGTTGTTTCCCTTA-----
DE0411	-----TGTACGATATTGGCCGCTTTGCCATCTTTCGTTACCTGG-----
DE0721	-----CGCGGGGACTCGCTCTGTTTTTATGCCTTAATCAGTTCC-----
DE0806	-----AATCTCCGTCCCTCTAAGTTTTTCCGCTTTCCTAATCTGT-----
00DINI41	-----GAACGGTCTTTCGTATCACCTAATTCTGGTTGGGGGGCCA-----
00DINI38	-----CGACGTGTACGAGTAGCGGTTAGATCAGGTTAACACTTT-----
DE0711	-----GCATCTCCGAGGTACGTCTCATTTTCAG-TTATGATTTTGGT-----
DE0232	-----AATACCTCCAATTCGAGGAAGGCCTTTA-GTGATACTTCTT-----
DE0617	-----TGTTCGAATTCGGGGTTTGTAGTA-TTAGTACTTTGCTGT-----
DE0313	-----AGCACACGTGCGTTTCATGTTTCAGTAGGTAGGTAGCTGT-----
DE0623	-----TGAGTTAATGTTCCATTTCGATTAGCTAGTTAACAAAACG-----
00DINI08	-----TTACGTATTAGGCTTCGAGACACTA-ACGGTTATCAGTATC-----
00DINI28	-----GTGTTATGAAATTATAGGCGTCTCGTAAGTAGACGTTTA-----
00DINI25	-----GTATC-CGTATCATGATTCGA-TCGTTG-CCGGTTAAAGCGTT-----
DE0224	-----AGAAGGGCCATCATGTATTATGAGTCAA-TGGTT--CCGGTCC-----

8. APÉNDICES

DE0113	-----CCAGCTGCTCGTAAACGGTGAAGTTAAGGTACGGTCGTTG-----
DE0716	-----ACTATACGACACAATTACAGGGTTATTCGTTTTTATCCCT-----
DE0425	-----AGAAAATTAAGCGGTCGGCT--GTCTCATTGGTTTTGTTCCC-----
DE0811	-----GTCAGCTAATAACGCTCTCGAC---ATTCCATTTCTCTCGTTG-----
DE0529	-----TGCCCTGCTCTATAGATTACAGGTCGTGTGTTTCTGCCCG-----
00DINI01	-----TAATCCAGAACTAGCCCTCCGCCCTCAC--TT-AATGATGTGT-----
DE0401	-----ATGCTAATCA--CACCTTCAC--TTTGACGATGTTTGAACGGAG
DE0124	-----GGTCTGCTTT-AACCTTGCC--TATTTCCGTGTGGCACTGTG
DE0303	-----ATGCCTACGTT-TACCCCGACA-TCATTCAGTGTG-CACTTA-
DE0414	-----TCTCTGTGAATAAGTTCCCTGATTGCTCTCTGACCATGT-----
DE0834	-----AGTTCTCTCTGTGTCAATTGT--TGATT-TTCCCTGCTTTTTC-----
DE0630	-----TAATTAT-TATCAACCCGCTCTATTAGCTCATGCAATCGGG-----
DE0217	-----CAAGGGGAATGTAACCCTCGTCTCC---AATGCCGCCGTCGAG-----
DE0627	-----AAGTTTCCACAAACCTCGTCTTGTTAAGTGCAGCCGTATA-----
DE0620	-----TGTAGTTCTTGGAATTGT-GTGC GTTTTCACCAAACCTCGAG----
DE0304	-----TCTAAGTTCGGCGTATTTGATTTTACCCACTCTCTTCTA-----
DE0607	-----TGCCTTTTTAATCAGTTGCCCCACTACCGTTGTTCCCTCTG-----
DE0413	-----GCCCATTTATCCTTGAAT-GCCTACGCCTCTTTTAGTTTTT-----
DE0519	-----CGCTATTCTTGAATTGATTACCCCGATTCTGTATTTAAGG--
DE0524	-----TCCTAGTTTAGCGTCGATT-G-TTACGCCGACGTTTATTATG-----
DE0812	-----TGACCATGGGTTA-TGTCGATT-GGCTACGTCTA-ATTTAATG-----
00DINI15	-----ATCTTAGTTGACAATTCCTCGCTTGGCGACTTCTGACGC-----
DE0314	-----TTAGTCCACGCTTTTTTCCTTTT--ATTTCTGCCGTTTCGTA-----
DE0525	-----GTATTTTTTATCTGTTGATTATTTCCAATCTTATGTGTG-----
DE0829	-----ATCTTTTGCATGACGACTATTTACTAACTTTTCTCTAG-----
DE0507	-----GAGGTTGATATCTGTTCCATGCTTATTTCCCTACTGGTTTA-----
DE0609	-----ATGATGAGTTCTTTGCTACTATTTTA-GCACCTATTTTCTA-----
DE0804	-----GTACTTGTTTCAGTCCTACATCATACTCATACTTTCACACG-----
DE0518	-----ATAGGTGACACTACTTATTACCTACCTGTTCCGTTCTATA-----
DE0708	-----GCTCGGGTGTTTAATTGCTGTAAAAGTGGTTCGTTTCATA-----
DE0723	-----GCTCGGGTGTTTAATTGCTGTAAAAGTGGTTCGTTTCATA-----
DE0833	-----TGAAGCGGATTTCTACCTATTTTAATATT--TTCGTTCTGCG-----
DE0123	-----GTAAAGAGACACGGCGACGTCGTTTACTTCCTTCCTCTTC-----
DE0624	-----ATGCCGCGACTAGTCATTATACTTCGCCTATCCCCGACTG-----
DE0501	-----TGGTGATACACCTCGTAAATTTACTCTCGCTTCTTGCTAG-----
DE0223	-----GCCGTTCCGA-ACTC--CATGCTTATTCGTTCCCTGCATTGTG-----
DE0531	GAGCGGACGGTTCGGACATTCA-CACGCTTATTACATTCAT-----
DE0612	-----TTGTAATGTCCA-CGCATTTATCTCCTCCCTTCATGTTCCG-----
DE0703	-----AGGGCACTCTA-CGCGTTTAGTCTCCTTCTTCATGCTCGGG-----
DE0211	-----GCTCTTGTGGCTGGTTAATGACTTCTC---TTTCCTTGAAG-----

8. APÉNDICES

DE0430	-----ACGCGCTGGCTATTTGCTGGCTTCCTGTATTTCCCTTCTGT-----
DE0813	-----TAAAGCGCTAGCTCCTCTATGTCCCCC---TTTGCAGACCTA-----
DE0216	-----GGAACGTACCGTCG-CTTGCAACCTATCATGATCGGGTTGT-----
DE0309	-----ATGATGTAACCTCT-CACTTACCCGGTTATAACTTCAGT-----
DE0502	-----ATTTCGACTTAACATCCTCGCTCTCCTCTTGTTAACCTCG-----
DE0516	-----AGGCACCTACCATGC-CTCTCTCC-CTTGTTAATCCCAGAGTA-----
00DINI19	-----TCTATGTGTCTACATTTTCGTCCAGCGGGTTGAGGCGGTTT-----
00DINI36	-----CGACTTAAGTAGAAGTCATTCGGCTGGGGGATACCTTCTG-----
DE0615	-----TGTGCCAAGGTTATATTTACATCTAAATCATACTCCACA-----
DE0709	-----ATGTTCCAACGCCTTGGGTCTAT-TAATATATTAGCCACAC-----
DE0212	-----CGTCGGGGTAGGT---AACATTTGATTTTCGGCCCTACCCTTT-----
DE0528	-----GGGTCTATGTAGGTG--AACCATTTCGATTTTCATTATGTAGT-----
DE0419	-----TATCCGAG-ATGTC--GAGTTTCTATATTTAGCCCTAGACTGT-----
DE0310	-----TGTATGTCTATACAGTTCGGAACATTCAAACCATCCAGT-----
DE0706	-----TGAGCCTGCGGACGT---AACGATTAATAATTATCTCCTATCGG-----
DE0403	-----TTCTCGAACTATTACACTTTGACTATTT-ACCTGCACTATT-----
DE0412	-----GGAGATAC-GTGTCTAATCCATTTGACCCCTATTTTTTT-----
DE0729	-----GTTATTTTACAATTCTGCCCTCTTTACATAGGAAGGAACG--
DE0704	-----GGGTGCTATGGGTCTTACACGAAAATTTGCTCTCTACTG-----
DE0712	-----GGCAGAGGCAAAATGGGTATTCAATCTAACAACCTCCCTA-----
00DINI04	-----TCAAATGCAATCATGCTGGGACCGGAGGTGTTTGCTATTT-----
DE0322	-----TTTCCTGGGAGGGCTTGATGTTCTTTTACTGATCGTTGG-----
DE0509	-----ATATGTGACCTACCTTGAG-ACGGCCCTTATCTCTATT-----
00DINI40	-----AGTCGCTTTTTCTAATAAGACCGGAAATTCGTTTATGGT-----
DE0726	-----CGCTGCGGATTACTACAGACGTCCGGCAGTTCTTTATTGT-----
00DINI21	-----TTTCACAGTGCCCTGTATATCGCTATGCAATCCCCCGGCA-----
DE0130	-----GTCGTGTTAATCGCGCGTTCACACTAGACCTTTTCATCAG-----
DE0105	-----ACTGA--TTATCGCAT-GTTCGTCTCGCGCAATACCAGATGG-----
DE0407	-----GCCGAGCTTATTATACCGTTCGTCAACGTTGAA---CAGATTA-----
DE0218	-----CACGTTGCGGCGCAGTATATCCTTCGGCGTTAGACACTCA-----
DE0220	-----TTGGTTAGGGGGCAGGCTATTATGC--TGTTAGATCAAAGG-----
DE0626	-----ATCGTGCGGATTACATACAGGCTTCATTATGCATCATTTGTG-----
DE0831	-----AACACTCTTCCATGCTT--ATATGCCTCATCGTGGGAAACTC-----
DE0109	-----CTGTTGGGCAAT-TATACTCTTTCGGGTTGCAGCATAATCC
DE0120	-----GAGTGTTTGTGCGACTATCTATACTCGCTCCGATTTTCGGG-----
00DINI09	-----TTGGTCATGCTGGAGCAGCTATGCTCGAGCAG--TGCGGTCG-----
DE0116	-----AGTTAGGCGAGGGCTGCTTCACATGTCTGTCTTTT-ATACT----
DE0301	-----AGGAGGCCAGGCGCGTGGTCATATTGGACTTTTTATGTT-----
DE0210	-----ACCCGGGCGGGGGAACCCCACGGTGCATTTAATGGCGC-----
DE0329	-----GTTCTCTACCGGAGCCGGGGCT-CGCACACGGTACGTCTAC-----

8. APÉNDICES

DE0219	-----TACTTTTCTCGCCAGGCTATGGCTGGA-TCATGGTACCTGT-----
DE0231	-----GTAAATTCTCTGG--AGGCTATGGTTGC--TAACCGTACCAGT-----
DE0214	-----CCAGAACTTAGTTGATCACTTTCCGCGACTCATA--CCGTTGG-----
DE0828	-----GACTTTGTCTCCTCGGTACGTG-CTCATGACTCGTTGGGG-----
DE0114	-----AGGAAGTTTCTTGCCACTTGGAACGGGCGCAGGTTTGTA-----
DE0621	-----CGTTGCCCTGTTCTTGCCGTGACTTGGAAGTATTTATG-----
DE0731	-----GTTATGCTTTGCTCTCGCTGCGACCTG--CTCAAGTTTATAG-----
DE0513	-----AGACAGGTGCTCATTCCCCGCCGGTACTCG--GCCATCTCT-----
DE0520	-----AGACAGGTGCTCATTCCCCGCCGGTACTCG--GCCATCTCT-----
DE0126	-----TATGCTTGCTCAAACGCTGCTTGAAGCCGCTGCCATTTGG-----
DE0228	-----GCTCTCACGGTGGGTGCAGGTAGGCGCTCCGATCGCTGGG-----
DE0315	-----AATTAGGGTGCGGGTAGTCTCGCCCCTCGTTTGGTCACGT-----
DE0121	-----TGCCATCTGCTGGCGTTGTCCCTGCCACGCTGCTGTGT-----
DE0202	-----ATGCTTCAGGAGTTCTGGCAGGCGC-TTACTCCGGGTAC-----
DE0229	-----GAGGGTCAGTA-TTTTCCCCGGCGGTTTTTCTCCCGCGC-----
DE0725	-----AACTAGTGGCTTCCAAGATTGCGATTTTTCTCTCGCCGGT-----
DE0802	-----ACTAATG-CCTGCAATCCTTCGCTTTTCACCTCCACTTTGA-----
DE0318	-----TTATTTCCCTGGGTTCCTGCAGGCCTGCTTCTCACCCCGG-----
00DINI11	-----TTACTGTACCTAAGACGGTGCCTCTTCGTATGGATCCC-----
DE0117	-----GTCCTGTCCTTGATGCGATGAGTAAGATCGTATCTTGTG-----
DE0122	-----GGTGGCCCATTCGTTGCAACCAGTGACGCAAC-ATTCGGT-----
DE0423	-----TGTCGTTCCCCCTTTGTTTCTATTAG-GACGCGTCCGCTTC-----
DE0514	-----TTGTAAAGTCGGTGCCATACGATTCCCTCATCCGCACGTGG-----
DE0610	-----ACAAATCTCGTAACGTGTTCTATTCTGTTCCCCCCTTA-----
DE0129	-----AGGCACACTAGTGCGGTAACCTGATGGAGCCAGATCCCTT-----
00DINI12	-----TCTGCAATGGAAGTACGCGCCTCACCATTCTGTTCAAT-----
00DINI26	-----TCTGCAATGGAAGTACGCGCCTCACCATTCTGTTCAAT-----
DE0204	-----ATATACGTGCGGTGTGAGTAGGGTTCTCATTTTCGTC-GTTC-----
DE0722	-----ATCTA-GTGAAGTGTATTATAAAGAACTCCTTTCATC-GTG-----
DE0618	-----TTATCAGTGTGCGGT-CAGGTATCAAAGTAGTCT-CATCCTC-----
DE0718	-----AGCTCTTGTGGAGTGCTGCTATTAAA-TATTCTACGTTGGT-----
00DINI22	-----CTTAATAATCGTGGCATGAGAGGAACGAGTGCAGCAATCG-----
DE0522	-----CTTAGTTTAAACAGATAGTCCCATCCGAGTTTATTGGTG-----
00DINI14	-----CCGTGTGTGGGCGTG-GTTATTGAATTCG-AGATAATGGCTT-----
00DINI30	-----CCGTGTGTGGGCGTG-GTTATTGAATTCG-AGATAATGGCTT-----
DE0415	-----CCATGGTCACTCTTCTGTTGAAAGATTTGTAGTTAATGGA-----
00DINI34	-----TATTGTATTTTAGATATTTTGAATCCG-AGTTTGTGCTATT-----
DE0628	-----ACTGTATTGTTTTAGTAAGTTATTTAAGGAG-TGTTAGTGG-----
DE0317	-----GAGTGGATGATTGATGGATTGTTGGG-TTCTATATTGC-----
00DINI27	-----GTATCCTAGGTAGAGAGCGAGAAGGGAGCTCGCTTGGTTC-----

8. APÉNDICES

DE0108	-----TAAATCCTCGGTAGGCT----GATTGAGGCTCGCCTTGTTCCT-----
DE0523	-----TGTGTAATCGTTGAATGAGGTCGGCACTTTTTTCCGCGG-----
DE0605	-----ATTGTGTTCAATCGTTTT-TAATGAGCGTACGGATCTAGC-----
00DINI37	-----ATGATTGCTTCATTGA-ACTAGTAACGGTTTATGGATCGGT-----
DE0402	-----CTACTTATGCGTGCATTCTAG-GATAGTAAGCCCCCCCCA-----
DE0405	-----TAACATCTG--AATTGTGCGAATTCTTCTATGTCCATCCTAG----
DE0426	-----TAAATGTACATTTGGTAATTGTGCGTGTT-TTGTATTCTTA-----
DE0128	-----TGTGGGACGTCAC-TATGATCCGCCCCAGGTGCCTTTTCTA-----
DE0330	-----GGGGGGGTTGTTAGACATCA--AGGATCTGCCATAGGACG-----
DE0428	-----GGTGTATCGTTGG-AGATAAGCGCACGTTTCGATTACTACG-----
DE0714	-----ATAATGTGTCCTATT-AAAAAAGAACCCCATACG-TTACT-CG-----
00DINI03	-----CCTATCAACCGTCTTTCCTACTGGATTGAGAAGGGTTTTTCG-----
DE0805	-----ACTTTTTCGCCCCCTTTAAAGTCTAATTACAGAATTGT-----
DE0504	-----GCTAGTG-GATGTGCAGG-TGATTCGACCAACCTTTTTCCGT-----
DE0506	-----GCTAGTG-GATGTGCAGG-TGATTCGACCAACCTTTTTCCGT-----
DE0115	-----GCTTTCGCAATGAGCAGCCTGCGTCGGACAAACCAGGG-----
00DINI31	-----GTGAACCAGCTGAAATGGGGTGCCGGCGCAGGATGTGCTT-----
DE0201	-----GATGGTGAG--GACCCCTATTGGTGGCCTTCG-AGGATATCTA-----
DE0809	-----GGTTTCCTTACTGAG--TGGCGAGCGATTATAGTTAAATGT-----
DE0822	-----CGTATACTCACTGT---TAGTGGCCGAGGGTTTTTTTGTTC-----
DE0324	-----GGGTTCTCTTCTTGTATACTGTATACGCCTAGTTGGAACG-----
DE0603	-----GTGTGGTTTTCTTCTCAATTACGCGCTACATGGTTAT-----
00DINI39	-----TGCTTTTGTG-ATCAAGCTGGCCTGCATGTGGATTGTTAA-----
DE0328	-----TGTATATTTGAAACAGTCGTTGGCTAAATTA-ATCGCTCTT-----
DE0503	-----TATGTCGCAGTTGTAGCAGCCGGCTTGATTACGGTACTAT-----
DE0410	-----TTGCACTAGGACCCAGCGAGACTCAGTAATTGTTGGTTAT-----
DE0421	-----AGGGTGCCAGCTAGGGTAGGTTTTTTTTTCCCTTTTAC-----
00DINI23	-----GTCGACCTAACTT-TAAGCTGTGTCTATAAATATACCTCG-----
DE0409	-----GGTAA--T-TAGGTTATATTCTGTCAAAATACGACACATTAG--
DE0207	-----ATACTTGCTGGCGTGTAATAATAGCTTATTTCTGAATTGGA-----
DE0321	-----GGGTTGGGCACAAACGCGGAG--ATTTGCATCTGTTGTTTCC-----
DE0816	-----GAATGCTGGGGATATACGTAGGGTGACCTCTATCCATTGT-----
DE0326	-----ATG-AACTTATGCCTTAACGTAGGCTAATTTGTATCTTTGG-----
DE0517	-----TATGTAACCTGGGGTTTTGCTTAGATTATTTTGACTCGAC-----
00DINI42	-----GATA-TTATA--TATTGCGTGAGATCGATACTCGTTATCGTAT-----
DE0521	-----CTTTTACTTTTC--TATTGTGTCAGATGTATTCTGGCCCGAC-----
DE0205	-----GATAGTTTCGGCTGCTT--TCGGTTGTGTTTTATTCTCCTCT-----
DE0602	-----GTAGATAGTCTCA-CTATTTACTCCGTGGAGTTGTTTTTCG-----
DE0213	-----CGGCGTTTAG--GTTAAATTCGTGTGATTTTATCGCATT-----
DE0417	-----GCCGTTGTTCTTGATTATACAAGGCGTTGATA-TCGCCCCCT-----

8. APÉNDICES

DE0830	-----TTGCTTTTGTATTTTATTAT--CAACTGTGGATAATCGCCCT-----
DE0305	-----TGGGTTGCGTTTG--CTTGATTGTACAGTGCATTATTATTTA-----
DE0106	-----TGAATATAAGTGA-CGGTATAGACTCTGGTGTACCCTTCT-----
DE0311	-----GACGGTATATGA-CTCAGTTGAC-CCGTCCAACCTCCCCTGTT-----
00DINI29	-----GCGGGCTGA-CTAGATTGAG---GACATATTCTCCTGTATCCTT-----
DE0613	-----TGATTTTTGAACGGAATTGTATATTACTCGTCTACCCGTA-----
DE0508	-----TGCCGTGTTTTTTAATGTATA--ATAGTTATGTACAGAACGT-----
DE0717	-----TGTGTTGGTTAGAATATAGCATAATTATATTTTTTTAGTCA-----
DE0515	-----ACAAACAGCAA-ACATAGATTAGTTACTTCTTCCCTCCCTC-----
DE0230	-----TCCGTTGGGTATAGGCGTACGTGCTGATTAGTGTGTTAT-----
DE0601	-----TAGTGTGCTTTAGTCGTATTTACTGGTCA-TGTGTGTAAGG-----
00DINI07	-----GGCCCGTTAACCGTTCGTAGTGATAAGATTGGTTATGGTG-----
DE0325	-----AAAGTGTCAGAT-GAGTTAATGAGTGCTCACGCTCAGTG-----
DE0608	-----GAAGGTACAGATCGTACTAATGAGTTATATCGCAGGAACA-----
00DINI35	-----GTCTCACTTCTTATCTACT--CGGTCATGCTGTTGGACAGTG-----
DE0810	-----TGAATTTATCACCAATTTTCGCTCATTTTCACTCGTCATG-----
DE0221	-----GAGTCGACCACTGGTACTCA-TAATGCAGACGTCCAGGTAT-----
DE0308	-----GCTTACCTTCCCTATTGAATAATTCGCATACACTCTGGTG-----
00DINI13	-----TCCCAGAGCCCTTCGTCCAGATCGGTTAAGTGACTAGTT-----
00DINI24	-----TCCCAGAGCCCTTCGTCCAGATCGGTTAAGTGACTAGTT-----
DE0222	-----TGGTGTCAATTGAGAGACTTACATGTAGTGCCGTGAACTTA-----
DE0125	-----GATGATAAGCATGGGTTGACCTGGCAAACGTCTTCCTGAG-----
DE0312	-----GGAAAGACATGTATTGTAGTGAAAATCTTCATCCGTAATC-----
00DINI18	-----TCACGC-GCAGTTTTTCTCATAGGTACGTGGCGTCTGAGAG-----
DE0416	-----CCATAGAT-GCAATTGAACCTATTGGTTGGTGACCCCATTT-----
DE0427	-----TTTATGC-ACACGGGACTTATACTGCTCGTTACGCCATTTA-----
DE0827	-----TTATGCTACCCGGGTTACTTTTTTCGTCACTGTACTCCTTC-----
DE0107	-----CGATGTGCTTAGAGCCGACCTTGGGGCGACACACTCT---CCC-----
DE0110	-----GGGTACCTAG---TGACTACGGGGTTACTGATTCTAGACCCT-----
DE0606	-----TCTCAGATAAAAA-ACTTCCTTGTGACGCTAATTT--CTCG-----
DE0826	-----GTGACCGGTGAGCTCATTGCCGGGTGACTTATTTTT--CCTA-----
DE0111	-----GCTCAGGGACTGTGAAGGAGCCTCCTGTCCAGTATAGCGG-----
DE0418	-----AATGTGGTCAGCGTACAGACGAGCGGAAGTAACCTTCGTG-----

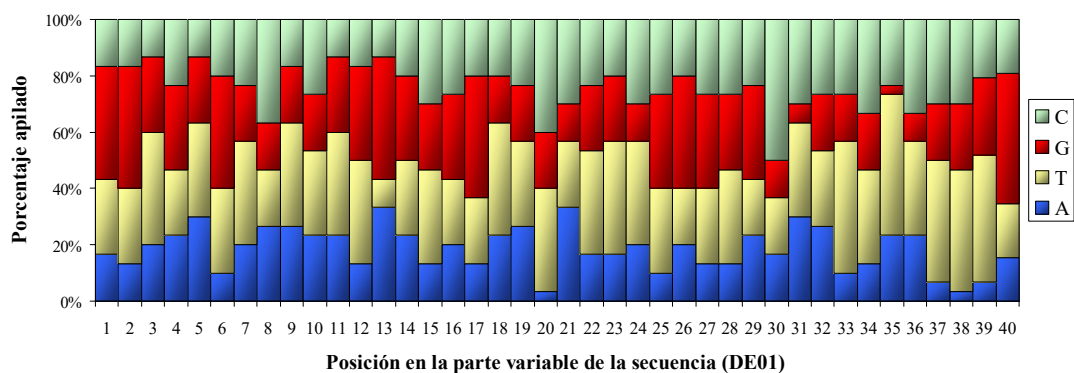


Figura A17. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 1 de la evolución de aptámeros de DNA (DE01).

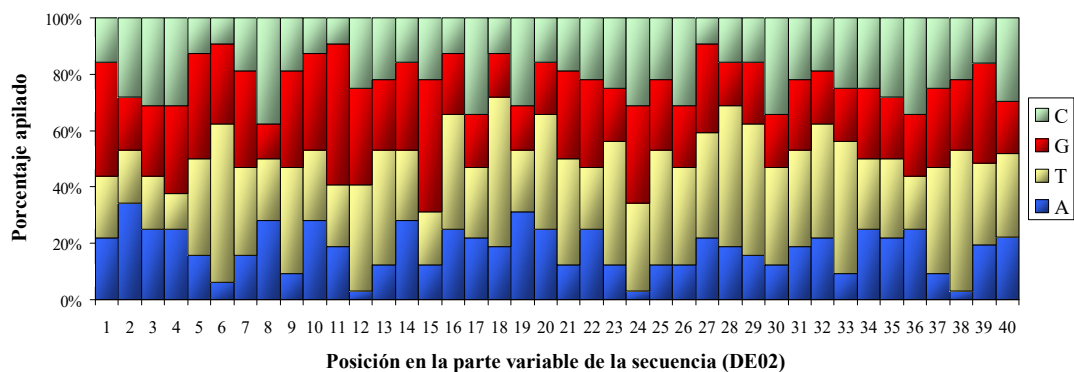


Figura A18. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 2 de la evolución de aptámeros de DNA (DE02).

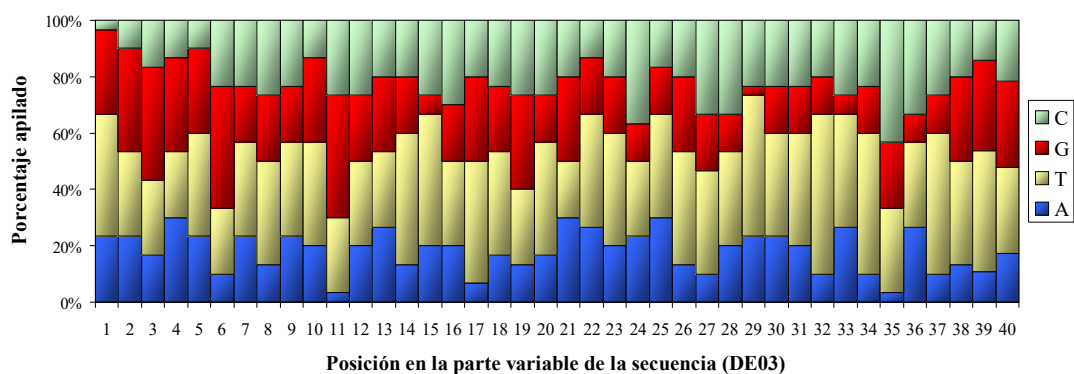


Figura A19. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 3 de la evolución de aptámeros de DNA (DE03).

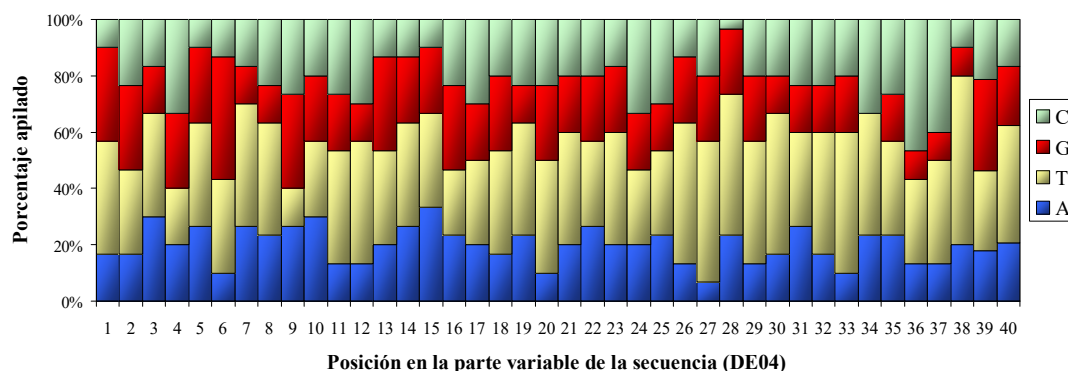


Figura A20. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 4 de la evolución de aptámeros de DNA (DE04).

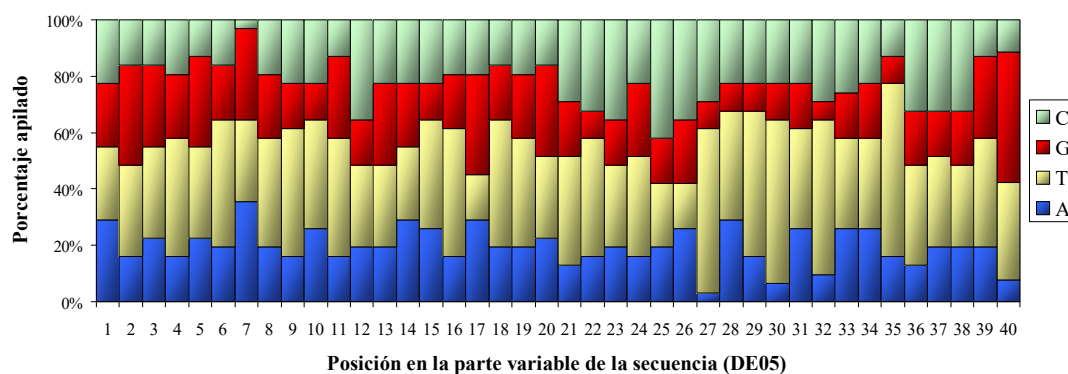


Figura A21. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 5 de la evolución de aptámeros de DNA (DE05).

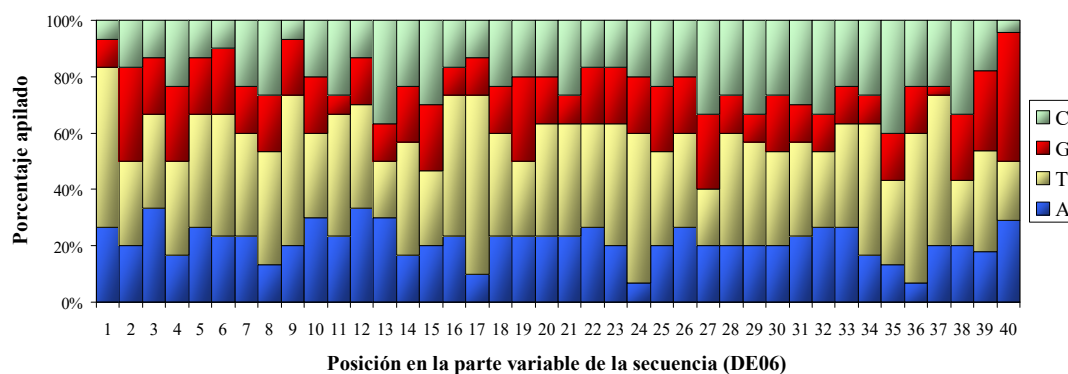


Figura A22. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 6 de la evolución de aptámeros de DNA (DE06).

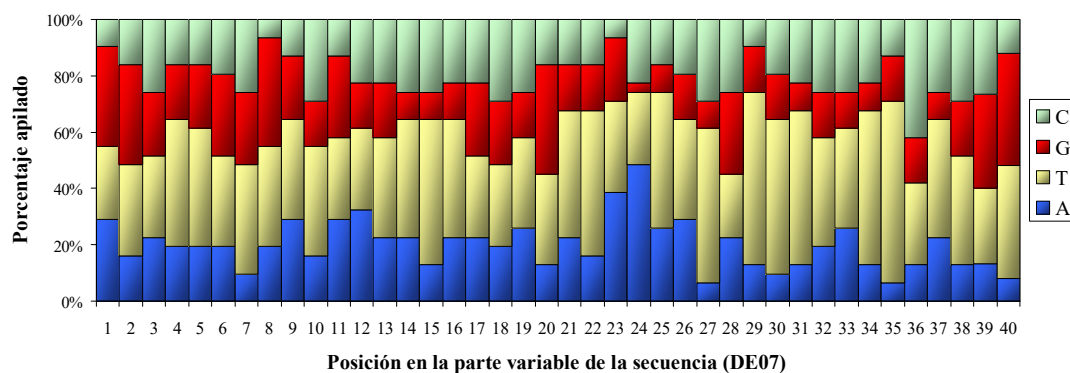


Figura A23. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 7 de la evolución de aptámeros de DNA (DE07).

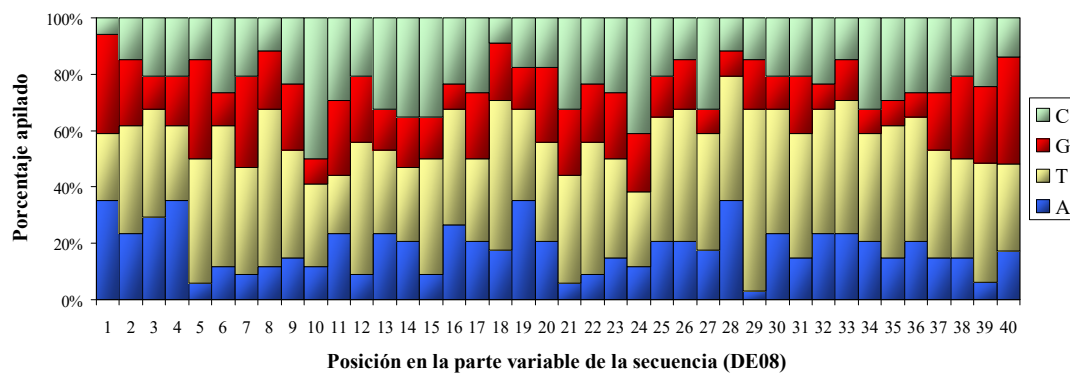


Figura A24. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 8 de la evolución de aptámeros de DNA (DE08).

8. APÉNDICES

Tabla A4. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs de la población combinatorial inicial (00RINI) y de cada ronda (RE01 – RE08) del proceso de RE. El alineamiento no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. Los dos números finales del nombre de la secuencia hacen referencia al número concreto del aptámero individual clonado.

Nombre	Secuencia 5'-3'
00RINI01	-----UAAUCCAGAA-CUAGCCCUCCGCCUCACUAAUGAUGUGU-----
RE0728	-----CGCAUUCCCAGA-CCAAGGCCUCGCCAGACACA-CACUGCC-----
RE0116	-----CGAAAGACUGCUACUGCCGUUCCGAUCUCAAGUUCUGUUG-----
RE0707	-----AUAUGACAGCU-CUUCCGUUCAGUCCUGACGUCCUGCUGG-----
RE0331	-----UCCGAUUAGAGCUC AAGCUUUCACUU-CAACUUUUUG-GGUG-----
RE0335	-----UCCGAUUAGAGCUC AAGCUUUCACUU-CAACUUUUUG-GGUG-----
RE0111	-----GUUACAGAGCAGGCUUUAAUGUAUAAUUUUUGCGGUGGU----
00RINI20	-----UACGUUAAUUC AUGUGUAAUGUGGACUUAUCUGCGGAGG-----
RE0419	-----GAACUAAAACG--CGUUUGUAAUUGCUGCUUCUCUUGGGUG-----
RE0613	-----AAUUAACGAUCGGGUGUGUCUGCUCUUCUCCCCGCGGCG-----
RE0313	-----UAUUGUGGUCAAAACGGCCGUUCAUAUCUGGCUAAUGUC-----
00RINI12	-----UCUGCAAUGGAAGUACGCGCCUCACCGAUUC-UGUUCAAU-----
00RINI26	-----UCUGCAAUGGAAGUACGCGCCUCACCGAUUC-UGUUCAAU-----
RE0705	-----AUACUACUGCAGAGGGUGCUUCGCUCCUACCUUCGGCG-----
RE0810	-----GAAGACGUGACGCCUGCACUUGUUAAUUGGCUGAGUG-----
RE0813	-----GAAGACGUGACGCCUGCACUUGUUAAUUGGCUGAGUG-----
RE0719	-----CUCCUCAGGUCACGCCUU---CUCGUUAGACGUGGCUUUUGG-----
RE0107	-----CCCAUCAUUGUUUCUCUCCACACUGU-UUUUGGAUGGGUG-----
RE0112	-----UCUGCGAAGCCUGUACCAUUCGUUUUAUCCCGCACUUGC-----
RE0125	-----AGGUUACAAAGCUUUG--CUUCAUCCGAUACCUUUGCUGGC-----
RE0404	-----UUACAGAUUCGGGGCGUCUCUCCGAUACUCCUAUGUUG-----
00RINI35	-----GUCUCACUUCUUAUCUACUGGCUAUGCUGUUGGACAGUG-----
RE0817	-----AUCUGGCACGCUUACGUCU-CACAAUCUAAUCCUUCGUGG-----
RE0212	-----GUUAUGCU-UGAGUCU-CAUCCUUGGCUUCUUGAGC--UUUUGG-----
RE0827	-----GCGCUAUUAGUGU-CAGCGU--GUUCCAGAGCGGUUUUGUGG-----
RE0219	-----AUCCGGUGAGUC--CUGCGUUGGGCGCCGAGCUUUAUCGUG-----
RE0102	-----AUUGU-AUGUUAUUUAGUUA-CUGCGUCUACCCGACGGUGUG-----
RE0213	-----ACCAUCACGUACCUCUAUCU-UUUUCUUGCUGCGCA-UACG-----
RE0120	-----ACUGUAAUAUCAUUUGAUGAGUUUCGCUUGCAUUAUUGG-----
RE0126	-----ACUGUAAUAUCAUUUGAUGAGUUUCGCUUGCAUUAUUGG-----
RE0512	-----GAAGUGAUGUAGUUACAGCAGUAGCCGUUCAAUACUGCG-----
00RINI28	-----GUGUUAUGAAUUAUAGGCGUCUCGUAAACUAGACGUUUA-----

8. APÉNDICES

RE0614	-----UUAAGCGUAAAUUCUCGC-CCACGUAAUCAGGUGUUGUG-----
RE0802	-----UCCCAAUUCAGAGUCGGCACCACUUUACUGUGCGUUGUGG-----
RE0722	-----UGUUACUUUAAAGGU-CCUGGGUACCAAUUCACUCCUGGG-----
RE0828	-----UAUUCAUGAU-CCUCAGUCCCCUAUCACUCCAGGGCG-----
RE0622	-----GAUACCGGGCAAUACCUCUAUACAGUUUAACUCCGCGGG-----
RE0402	-----AGCCCUGACUUGACUUUGUCUA--UACCGGGUACGUUGUGGG-----
RE0428	-----AGCCCUGACUUGACUUUGUCUA--UACCGGGUACGUUGUGGG-----
RE0610	-----AUCCUGGUUUCUGCUUCUCCG--UAAUGCCUACAUUGCGUCG-----
RE0519	-----UCUAACGUGUCGCACCUGGCCUGCCGAUAUCUCUGCGUGG-----
RE0230	-----CAGUUGAAAAGACAUUUCUUGUCCCUUUUUCGUCUGAGCC-----
RE0806	-----AAGACCCUUCAUCAAGAACUUUCCCGCGCCUGUU--GCCUGG-----
RE0326	-----GGCUCUAAACAUGUGAAUUAACCUAAGCCUGU-UCGUUGCG-----
RE0524	-----GGGUUAAACAACUCCUCGCCUAUUUGCGUGUUGCUGCG-----
RE0329	-----GGUGUUAUGACACUCUUGCGCUUUCUGUAUCGUUGUCCC-----
RE0625	-----CGGUUUGUACACUUAUGAUUUCGCCUAUCCUUGCGGGCG-----
RE0533	-----UAUUAUAAUCACGGCACUAUUGCUGCAUCCGUUCCAUGG-----
RE0731	-----GCCCGGGGCCGCUAUGCGCCUAGUCAUGCGAUCCUUUG-----
RE0807	-----UCAGGCCGGAGAUACAACG-ACACAUACGCUUCUUUCUUCG-----
RE0609	-----GUUAGCAUAUCGCGGCUGAUCAGUGCGAGAAUUGUUGUUG-----
RE0624	-----UAGGAAUACACAUC-CGGCUUAACUACGCGUGCAUC--CGUUG-----
RE0117	-----UAUCUAUUACUCAAGAGC--GUGUCGUUCGUUAUGACAAUGG-----
RE0422	-----UA-CUCUUAUCUACAACC--AUGAUGUGGGCGUUUACGAUUG-----
00RINI02	-----GACUGAUGAGCCGGU--GUGUUGGAUAUGGUUAUUAUAGU-----
RE0204	-----GCGAUUAUGGGGC--GCAACUUCACCAAUCUGGUUAGCUGUG----
RE0208	-----GCGAUUAUGGGGC--GCAACUUCACCAAUCUGGUUAGCUGUG----
RE0217	-----GCGAUUAUGGGGC--GCAACUUCACCAAUCUGGUUAGCUGUG----
00RINI10	-----UCACGGUGAUUGUCGUGC--UCAUUUAUUC--UUUGGCUAGCU-----
RE0305	-----GAUGCGGCUUUACGU---UUGCAGAUG-UAGUUAUAAGCUUGC-----
RE0409	-----GAGAGGGUGGUUUUUCGUCACUUGCCCAUG-U-GUGAUACUG-----
RE0307	-----ACGCGGAU-UUCGC---UCGCGGAUGUUUAAUUC-UGUUCGGGG---
RE0324	-----CGCCUCCUUCGU---UUAGUGAUGGUAAGUAACAUGCUCGGG----
00RINI11	-----UUACUGUACCUAAGACGGUGCGCCUCUUCGUUUGGAUCCC-----
RE0812	-----GGUUGUAUAGCUAAGGGGAUGUCCUCGUUUGUAACGGGCG-----
RE0432	-----GUGCGGUU-CUCGUGUCUCUACAGUGCUACCACACUCAUGG-----
RE0713	-----UAUCCGAUCGCAGGCGGUUUCUUAUAUCUACGGUGCUUGG-----
RE0803	-----CGCUGCCUGAGAAAUGGCCUUUCCUUGUUUAAACCGUGGG-----
RE0809	-----ACUCCGUCGCUCGA-AUUAUGGUGCUUUAUGAAGUGUUGG-----
RE0818	-----ACUCCGUCGCUCGA-AUUAUGGUGCUUUAUGAAGUGUUGG-----
RE0103	-----GUGGCUGAAUACGAUAUUAUUAUUCUUCUUUCGUGUGCC-----
RE0418	-----UCCCCUGGAUGGAACUCUCGAU-UUAUACUUCUACGCGGGG-----

8. APÉNDICES

RE0702	-----UACCUGGUUAGCUAUGACUAU-UUGGCCUCUAGGCGUGGG-----
RE0505	-----GGCAAUC-UGACGCUGGUUGU-CUGGACUAUUACUUGGUGG-----
RE0604	-----ACAUCGGCGACUCUACUUGUUCUCCAGCAAAACUUGUUUG-----
RE0224	-----CUCUCGCCUACUGGUGGCCUUUUUUCACGUCGUAGUG-----
RE0712	-----GCGGUUGCAAGGCGCGU-UCCUGAUUAUUGACUUGUUUGCG-----
RE0820	-----GGAUAUCCAAGUCCGCUUCUCUCUCUUGAUGGUCUCGGUG-----
RE0210	-----AUACUACCAGACCCGGCUAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCC-----
RE0218	-----AUACUACCAGACCCGGCUAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCC-----
RE0223	-----AUACUACCAGACCCGGCUAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCC-----
RE0227	-----AACUGGCUAGCUUGCGGCGUUUCUAGGAUUGCAUUUCU-----
RE0627	-----CCCUCUAUACGUUUCGGGGAUUUUCGUGGUUUCAUUGCGG-----
RE0320	-----GGCUCU---UUUCUGUUUCGAUGAUGCGCGACAUCUCCGUCGG-----
RE0701	-----GGCUCUAAGCUUUCGUUUCGUUCGUACGCUUCCUCGUGG-----
RE0330	-----CAACCGGCGCUUUCGAGUUGCGUUUUGGGAUGCUC-GUGG-----
RE0403	-----CUCCCCUCUGUACAGUUUCUAUUGGGAUUUGCUCCGUGG-----
RE0237	-----GUCCGCUCGUACCCUGCAGGGGAGACGUUGCGCUU-GUUG-----
RE0634	-----CGUUGCUGGUUGCCU-CGGGGGAUAUGUCUUGUUUUGUUG-----
RE0607	-----CGUAGUGGUUGAAUUUGUAGAGCUCUUCUGGUUUUGUUG-----
RE0721	-----GACCGCCGGGUAAUUUCUGUUGCGUUUCCGUGGGUGG-----
00RINI19	-----UCUAUGUGUCUA-CAUUUCGUCCAGCGGGUUGAGGCGGUUU-----
RE0511	-----CCCUACGUCUCUA-UGUUCUGCCCC-CGGGAUGCGCUGUUUG-----
RE0118	-----GCACGGGGGUUGUGCCUUUAUUUAUGUAUGUGGUUCGGG-----
RE0214	-----GCUAUGGGGUU----CAUUGUUUAUGCGUGUUGAUCACGUGU-----
RE0617	-----AACCGG-ACAUAUCGACA-GGUGCUUCAUAUAUCUAUCGUGG-----
RE0621	-----CAUCUAGUACCUAUCGGC--GCUGUUUCUUAUAACC-CGGCG-----
RE0114	-----GAGAUUG-AGCUAUCGCC--GGUGCAUCUUGUUAUUCGUCCGG-----
RE0306	-----GGCAGC--CUAUUACUAGUCGGGCCCGUUGGUCAACUCUCC-----
RE0715	-----UCGAACAGCGUCUAUUGCCCAGUCGUGGCCCCUUGUUACG-----
00RINI03	-----CCUAUCAACCGUCUUCACUGGAUUGAGAAGGGUUUUUCG-----
RE0334	-----UGCGUUGCCUAGCGCUGGCUCGUGGACGUUGGCUCGCUGG----
RE0328	-----CAGCGGCA-GUUAGUA-UUCUCCGCUCUAGGGACUCUCCGCC----
RE0831	-----GUAUCAACUUAUCCGCA-GUCUCCUAUUCGCGUCUUCUGGG-----
00RINI15	-----AUC--UUAGUUGACAAUUCUUCGCUUGCGGACUUCUGACGC----
00RINI05	-----UUACC-CUUAUUCUCCCGGAUUCUUCG-CGCUUAGGUCCUGU-
RE0130	-----AGCUGGCUACC-UUCAUCGCGGUGUCGCUCCGUCGCUUGG-----
00RINI29	-----GCGGGCUGAC--UAGAUGAGGACAUAUUCUCCUGUAUCCUU-----
RE0615	-----GUACUUACC-UUUAUCGAGGCGAU-UUCUCGAGGAUCUGUC-----
00RINI33	-----CGCAUUUCACAUGAUUUUGCGUUGUGGUACGGUGUUGU-CG-----
RE0808	-----GUUGUGCGCAUGUGGUAAACGGUUAUUUCCUGUUCGUGCG-----
RE0501	-----UACGUCAUUGUGCAC-UGUAUCCACCGUAAUCUAGUUGG-----

8. APÉNDICES

00RINI41	-----GAACGGUCUUUCGU--AUCACCUAUUUCUGGU-UGGGGGGCCA-----
RE0216	-----UCUUGCGUUCACGUUUUUACCAUGGU-UCGGUUGUUUUUUG-----
RE0225	-----UAUCCCGGCGCAUAAGGACCGUUGUCUCAGAACUCAUUGU-----
RE0718	-----AUCAUAAUG--CGUCGACCUGAAAACCAUGGUGUUAGUUGG--
RE0209	-----GUCUUUGUCUCGUCGUUCCACUCUCAGGCUUUUGUUUCGUC-----
RE0211	-----GUCUUUGUCUCGUCGUUCCACUCUCAGGCUUUUGUUUCGUC-----
RE0311	-----UAAAUCGUUUUCUGGACUCUCUCCUUCUUGUUCGGGUC-----
RE0520	-----CCCACAUGAACUCGUCUCCUUCGUAGUCUCGCUUGGUGUUGG-----
RE0716	-----GCUGAUUAACCCGGUACUGCCGUGUCUCUGUGGUCGGUGG-----
RE0425	-----UUGCUAACCUGAUCUCGUCGGUCCAGGGUAGAUUGUUGG-----
RE0629	-----AGUGCAAACCUUAUGCCGUCGGUGC--GUGUCGAUUGUUGCG-----
RE0507	-----AGCUGCCCUAAUUCGCGUGAUCCAUGCCCGUAACGUCG-----
RE0521	-----AGCUGCCCUAAUUCGCGUGAUCCAUGCCCGUAACGUCG-----
RE0431	-----UAGCUGCCUAUUCCAUUAUGUACCCUUGCCCCCGCAGUG-----
00RINI21	-----UUUCACAGUGCCCGUGAUUAUCGCUAUGCAAUCCCCCGGCA-----
RE0233	-----CGCUCCUCGACUCAUUGUAUCCGAUUCUGCAUGCCCUUG-----
RE0714	-----CCAUGCUUUCUAAUCUUUAAGUCGUUCUCCUUAUGCGCG-----
RE0406	-----CGUCUUCUCUAUUCGCUAUUCGGCUUCUCCAACGCUGUCG-----
RE0429	-----CGUCUUCUCUAUUCGCUAUUCGGCUUCUCCAACGCUGUCG-----
RE0612	-----GUUGCUUCCGUAUGCUAUAUCCAUAUACCUCGCCUCGUCCC-----
RE0228	-----CGGAUUUUUGUACAUGCCUAUUCAAACACAUC-UCUCUGGG-----
RE0510	-----UGACUUGU-UUCGUGGCUUUGCGACCAAUUCGUCGGUGGG-----
RE0221	-----GUGAUGCUUCUAC--CGGCUUGUGCCGCCGUUGACAUUAAUG---
RE0514	-----AGGUGUGAUCCUCUAGCUGCGCUUUGGCCAUCGCGGCC-----
RE0222	-----AUCGCUUACUAUGCUACCGCCGGGCGGGACCGGGACCGUC-----
RE0618	-----GUAGUAUUCGUAUUGCU-UUAAUGUGUUCUCCUACCCGCG-----
RE0513	-----ACGCGUGUUAAGGCAUAGUGCCUCGAGUUAUCCUGCGUGCG-----
RE0526	-----CCUGUUUCCGGCACA-UGCUUCGGGGUGUC-UCCGUCUGG-----
RE0530	-----UUCCACGCUUUAAACAGCUACGGGCGCC-UCCGUCUCCUGG-----
RE0626	-----GUGCCACGGUCUGAGCGCCUUUGACUCAGGCUUACCUGCG-----
RE0727	-----AUUGUAGCCGCUUAGUCCAGUCAUUAUAGCU-AUCGGGG-----
00RINI07	-----GGCCCGUUAACCGUUCGUAGUGAUAGAUAUGGUUAUGGUG-----
RE0115	-----UAUGCCGGU--GCAGUUGGGCGUGCUCGGAUUGGGUAUUCGG-----
RE0312	-----CGAUGAGUUCGAU--CUCCCCGUUCUGAUCGACGUGAGCGUG-----
00RINI09	-----UUGGUCAUGCUGGAGCAGCUAUGCUCGAGCAGUGCGGUCG-----
RE0633	-----CACUGGUAACCGUUGUGCUGGUA-GCUCCU-UAGUGCGCGCG-----
00RINI27	-----GUAUCCUAGGUAGAGAGCGAGAAGGGA-GCUCGCUUGGUUC-----
RE0104	-----GGUGAGCU--GUCGUGAGCUACGUGU-GCUCGCUUUGCCGC-----
RE0236	-----CUUGAAAGGCCGAUCGUAGAUGCCCCUCCUAUCCUCC-----
RE0616	---CUUCGUAGAUUUGGUAGCCCGG-CGUAG-UGUGCUCCUCUG-----

8. APÉNDICES

00RINI32	-----AAGGUUUAGUUCUAUUUACAUGAUGGGUUUCCUUUCGUG-----
RE0815	-----GGCAUAGUUCAGGUGC-UGUUUGUUUCGUAUUUCCUGUGG-----
00RINI16	-----CUGCGCCGGAUAUUUCCUAGUUAGUUUUGCGUAUUGACC-----
RE0411	-----AGAUACGCAAUCGGG-AGAUCUUUGAUUCUGUUCUCCGUGG-----
RE0516	-----GCAACCGCUAUCGCGCGGAUCUGUGCUGUUAUUCGUGGCG-----
00RINI18	-----UCACGCGCAGUUUUUCUCAUAGGUACGUGGCGUCUGAGAG
RE0522	-----GGCGCGCAUCCGGGUUCAUGUAUUCUAGUAGGAA--UGGCG-----
RE0601	-----UAGUUUGAUCUAUAUCGUCCAUACCUCUGUACUCUGCACG-----
RE0709	-----CGUUUUAGGUAAGUUCUCUAGGGUACCCUACCCCG-GUG-----
00RINI17	-----CCGGCAUGAUCGUACAUCUUUUUGGUCCUCUUCACACC-----
00RINI42	-----GAUAUU-AUAUAUUGCGUGAGAUCGAUACUCGUUAUCGUAU-----
RE0315	-----CCCGU-CUAAAGUACUUGAG-UCGUUCUGCUGUGUCGUCUGG-----
RE0502	-----GAUUUCAGUGACUUGUGUG-GUCUGGUUACGCGCUUCGUG-----
RE0603	-----UGGAUAU--GUGGUCUGUAAGCGUCCAUUCUAC-CUUCUUGG-----
RE0215	-----UACGUUACAUGUAGUGAGCUCGCAUUCUUCUGGUGUUGU-----
RE0421	-----AGCCUUCGGUUAUAGUGC-CUCACAUUUGCUGUGAC-CUGCG-----
RE0824	-----ACGGUCCGGCCACGACUAGCGCUGUUCUGGUCUGGGGG-----
RE0830	-----ACGGUCCGGCCACGACUAGCGCUGUUCUGGUCUGGGGG-----
RE0332	-----GAGACGGUUCGGACUUCA-UAGCGCGGUCCUUGUCACUGGG-----
RE0413	-----GUAUGGUGUUCGUUAUUCGCGGACGUUGUCCGAGUCGUGG-----
RE0420	---GAUCGCUGUGAUGUCCCUACUAGCAGGCGGUUGUACGGUG-----
RE0417	CGCGCUCCUCGGUAGUCGUCAA--AGGGUAAGGUCGAUUUGG-----
RE0706	-----UGUCCUAGUCCUCUACUAGAAUAAUGUUGUUCCCUACGCG-----
RE0101	-----UUGGCUCUGCUUGGCC-AACCUCGUCCGAUUUCCCCGUUCG-----
RE0814	-----CGCGGCUCUUGGUGCCGAACGUCAUACUACUCUCUGUG-----
RE0309	-----UUUCGGCACCCAGGUUCCAUACUCGGCUGUAUCAUGGGUG-----
RE0822	-----CAAGAUGCUGGUGCCAAUUCUCGCUCGAUGUAUGGUGGCG-----
RE0119	-----GAGCGACUCGCAGUCGCACGCUGGCCGAACGUUUUGUGCC-----
RE0129	-----GAGCGACUCGCAGUCGCACGCUGGCCGAACGUUUUGUGCC-----
RE0206	-----GUCGACCGAUGGACUCACAU--GACGCCCUGCUGUACGGUU-----
RE0128	-----UGGUAUUCGUGAGCAUCUCCUGAUUUCGUCGCC-GGCGCC-----
RE0325	-----UGCUACCGAGCACCUCUUUUGGACCCGGCGCG-UACGUUCG-----
RE0327	-----AUAGAACAUGUCUGCCAGGCA-CAUGCGUAUUUGGGUUCG-----
RE0801	-----UCAUAAAUUCUAGGCCGUACGUCUUGUGGAUUUCACGCCG-----
RE0518	-----GCGGAUUCUGGUCGUCGUCAAAGCACGUUUGUCUUCGCG-----
RE0703	-----GCUAUUCGGAUUAUUGCU--UUUUCAGCACAGUUUAUGUUG-----
00RINI23	-----GUCGACCUAACUUUAAGCUGUUGUCUAUAAUAUACCUCG-----
RE0508	-----GUCGAGUUGACGU-AAGAGGUUCCAUCUGUUGACCACUGG-----
RE0504	-----UGGUCGAUACAGCUGGAAUCCACUGUGUAGGAAUGCGGGU-----
RE0620	-----ACAGUUGG---CCACGGUCUUAAGAUUAUGCGUUUGUCUUCUG-

8. APÉNDICES

RE0108	-----CACGUCAGCGUUACCGCCUGAAUUCGACUUUCUUCUACCG-----
RE0529	-----CGGGUCAUCGAAACAGA-UGAAUACGGUUUGCUACUUGUGG-----
00RINI37	-----AUGAUUGCUUCAUUGAACUAGUAAACGGUUUAUGG-AUCGGU-----
RE0319	-----UUCUCGAUGGCUC--UGCCACGCAACGCUUUAUCACAACG-----
RE0710	-----UGGAGUACCUCAGGAAUUCUAAAUGUUUCCUCCUGUUGG-----
RE0826	-----AGUCCUGGCACUCUAAGC-UUGCAACUGUGAACUC--GUUGGG-----
RE0105	-----UUUUACCACCGAAUGGCUAUGUAUUCUUUUGUGGUGGCCU---
RE0805	-----UCCAUCGUGUACCUACCUAGGACGCUCCAUUCUCUUGUGG-----
RE0424	-----AGCGGCAGCUCGUGACUCCCAAUAGAGCUCUAUACUGUGG-----
RE0122	-----GUACGGGAAGUUAUCUAGAUAGCUCUGC-UGUUA AUGUCA-----
RE0232	-----CCGGGUA AUGCUUUGGGGAGCUGUGC-UAAUG-UGCAGGCC-----
RE0220	-----CAUGAGUGCACGGUCA AUGACCU--UUCAACGCAU AUUUGG-----
RE0611	-----GCAGCGACACUUAACUGCUUUAACG-AUGCUUUGUGGGUG-----
RE0408	-----AAGCAA-UGGCCAUCUGUCGCGCUCAGUAACCUCCUUCGG-----
RE0704	-----UCUAGGCAUCUGGGAAGCUGUAGACGAUCAACCAACCUCG-----
RE0234	-----GACGUGUUAAGAUGCGCCCGUGG-GAAUAUCAUAACGUG-----
RE0407	-----GUAUAGAAAGUGCGUGUGUGGCGAAUAUCAAACCGGGC-----
RE0302	-----AAGGUUUCGUAACAUGUGACCGUGGCCAUUCCUCGGCG-----
RE0314	-----AAGGUUUCGUAACAUGUGACCGUGGCCAUUCCUCGGCG-----
RE0711	-----CUUGUGGUGUUGGGCG-GACCAUGCAAACGCUGCAUUGUGG-----
00RINI25	-----GUAUCCGU-AUCAGAUUCGAUCGUUGCCGGUUAAGCGUU-----
RE0106	-----UGCAUUC-U-UUAAUGGUAAGAU-GUUUCAUGUUUACGCGGUAG-----
RE0202	-----CUGCCUACU-GUAAUUGCGUGCAGAAUGUGCCAUGUUGCG-----
RE0517	-----GGCAUUGUAGUCUUUUCUGGUAGAAUGGUUUGUACGGG-----
00RINI34	-----UAUUGUAUUUAGAUUUUCCGAAUCCGAGUUUGUGCUAUU-----
RE0605	-----AUUCUGUUGUCG-UAUAUUAUGUGGAGCUUCCCCGUUUUG-----
RE0527	-----CAUAUCUGUGUAAAGCUGCAUGCCUAUGCUUGGUUGUUG-----
RE0729	-----GACAGGUUUGUGUCUAUC-GGAUGAUUAUUGUUGCGUGCG-----
RE0310	-----GAUUUUCGUAAGUGAGCGA--UUUCGCGUGGGGUUACCUUGU-----
RE0322	-----GAUUUUCGUAAGUGAGCGA--UUUCGCGUGGGGUUACCUUGU-----
00RINI36	-----CGACUUAACUAGA--AGUCA--UUCGGCUGGGGGAUACCUUCUG-----
RE0414	-----UACUAGGUGAAUAGGUUUAAGUUAGAAAUGCGACGUGG-----
RE0819	-----CCGCCGAGAUUGUCGUAGGUUUAAGGUGUACAUUC-ACGGGG-----
00RINI40	-----AGUCGCUUUUUCUAAACUAAGACCG-GAAAU---UCGUUUAUGGU-----
RE0412	-----UUGCUCAGUCAGCGUG-GAAUAUCUUGUUUACUGAGUCGG-----
RE0127	-----UUAAAGACAACCUUC-CCGCGUAUCAGUUUGUUGUAUUGGC-----
RE0203	-----UUCUACUGUCCGGCUUU-ACAU-UACUUGUCUUUCUCGUUGG-----
RE0121	-----GGUGCUGUCGUUGCUUAAUCAAGUUAACGUUCGUGAUU---
RE0226	-----UUCGCAGUAAGAUUUUCAUUAUAGCAAAGUCGUGC-----
RE0124	-----AUUCAGGUCGUACUGAUGAGUAUAAC-GUUGGU-UAUUUGUG-----

8. APÉNDICES

RE0131	-----AUUCAGGUCGUACUGAUGAGUAUAAC-GUUGGU-UUUUUGUG-----
RE0410	-----AAAACG-ACUACUCAGCAUAA---GCGAU-UAAUUGUGGUGCUCC---
RE0321	-----GAUCCCGUAGGGCCGGUAGCAGA----UCGCUGUGUUCGUGG-----
RE0602	-----AGCAAGAAGGACCGUUGCGGAUAGU-UUGGGUUCGUUCGUG-----
RE0523	-----AUUGUAAGCUUGAAGAAUUGUUUA-GACGGCGUUCUCUGG-----
RE0730	-----UGUCCGUAGGGUCUGUUGUAGG-UUAAACUUUGCUUUGGCG-----
RE0303	-----AGCCGGGUUGGAGAUAAUCGUUUU---GAUUGAGUUGUC-UGG-----
RE0317	-----AGCCGGGUUGGAGAUAAUCGUUUU---GAUUGAGUUGUC-UGG-----
RE0825	-----UGGUAUAUAUGGUUGCCUUCAGCGGUCGGGUAAGCGUGG-----
RE0525	-----AGUGGUGUUCGGACGGUGUUGUCC--GUCUGGUUCUGUUCG-----
RE0821	-----AAGAACGAAGACGGU-UUAGGA--GUCUGUCUUUUCACUGUG-----
RE0708	-----GCGUCGAUUUCUGGAAGCCGUUAUGA--GUCUGUCGCGGG-----
RE0816	-----CGAAGGUCUCUCGG--GCUAUUCCGA---UUUGUUGUGUCGCGUG-----
RE0109	-----CCGGGCC-CUUCUACCGCCU-CAAGUGUAGUGCGGCACCUU---
RE0829	-----GUCGGCCA-CUGCUUCUGCCAGCAAGUGAUGUGCGUUGUUG-----
00RINI31	-----GUGAACCAGCUGAAAUGGGGUGCCGGCGCAGGAUGUGCUU-----
RE0235	-----CAU-CGCAACGGGCCGGUUCGCGGGUCGUCCUUCUGCUGGG-----
RE0509	-----AUACAUGUCUGGCCCGGAUGUUGGUCAGCCUACUGCGGUG-----
RE0723	-----UACAGCGUCCACUGUGGUGGGU-GAGGAUCUGCGGUGGGUG---
RE0724	-----UGAGUUAGAGUUUCCCGGGUUCUUGGUAGACUAUCUGGGG-----
00RINI39	-----UGC UUUGUUGAUCAAGCUGG-CCUGCAUGUGGAUUGUUA-----
RE0531	-----UCAGCUCAAUCGAUUUGGACUUGCUUGGGUAUUCGUAACG-----
RE0308	-----AGCUAGUUCAAUUGUGCCAG-GAGACAUGCUGUUCAUUGGG-----
RE0430	-----GGUGCCUCUUCACGCGUGCCGG-GUUAU-UGCUGGUUGUGGG-----
RE0229	-----UAAACAUUUUCCAGCUGG-GGUAUCCUGGAACGGCGAGG---
RE0608	-----GUAUGAUCAACGUUUCUC-GGAUGG-GAUGUUCGCUCUGG-----
00RINI06	-----UAAUGGGUGGAAAUGGUAUUUCCUUGGUUGUUGU-GCUCU-----
RE0630	-----UCGGCAGGGUCCAAAAG---UUUCAUUGCGAGUCUGUCGUCG-----
RE0316	-----UAUUUGCUGGAAGGGGCAAUUUCG-UAGGAAUUUCUGUGGG-----
RE0720	-----CAGAGGAAGUACACGCACUCUGGAUGUGGCUAGUCGUUGG-----
00RINI38	-----CGACGUGUACGAGUAGCGCGUUGAUCAGGUUAACACUUU-----
RE0207	-----UGAUGUGUGUGACUGGCACGC--GGUC--GUUAAUGUUCGACUG--
RE0631	-----CGUGUUUCGUAUGUGG-GUUGGUGGUUAUCUUUUCGGGUG-----
RE0726	-----UCGGGUUAGUCUAUGUGUUGUGGGAGAUUAGGUUUGUUG-----
RE0301	----UGAGUCCGAUGGAGGCCGUCGUUGUG-AGCUGUUCGUGUG-----
RE0628	----UGGUUC----GUAGUCCUUGGGAGAG-ACCGUUCGGGUACGUUG-----
RE0323	----GACAUUGAAGGGUCUCGUUCGUA---GUCUGUGAGAUUCGUUG-----
RE0804	-----ACUGUCCCAUAGGUUAU--GUCUGCGGGAGUCUUUAACGUUG-----
RE0401	---CCAAUGUUAUUGGGGUGUGUCGUG---UACUGUG--UACCGGGG-----
RE0405	----UGUGAUAGUUGGUUGCG-CGCUG---UUCUAUGGAUAUCUGGUG-----

8. APÉNDICES

RE0415	-----UUGCCGCUUACGUGCGUGAUUGGCAGU-CCCUUGUCCGUGU-----
RE0416	-----UGGCAUGUUCGUA---GGUUGGGAGUGUCCUUGCUCUUCUUCG---
RE0110	-----UUGGCGACCAC-UUUCGAGGGUACUUAU-AUCCCCGAUUGCA-----
RE0506	-----ACGUUACGGGCUAAGUUUUUGCCUAUCUCU-AUUUGGGG-----
RE0606	-----CAG-GUUAGAACACAUGCACUAUAAGGUGAUGCGUGCUGGG--
RE0632	-----CUUACGGGUGAGCAG-UUUAGAACCUACGCAC-AUAUGUUGG-----
00RINI04	-----UCAAAUGCAAUCAUGCUGGGACCGAGGUGUUUGCUAUUU-----
RE0423	-----ACGGGAAAACAU-CCGGGCUCAGACUUGGUCGCUUUCGGUG-----
RE0717	-----UAAUAUGCCAGCCUAGUGAACCGAGCGCCUCCCCGGG-----
00RINI22	-----CUUAAUAAUCGUGGC--AUGAGAGGAACGAGUGCAGCAAUCG-----
RE0113	-----GGUCGAAUGGGAUCAGCCAGUGGUAGUGGAGAAUUUAAUG-----
00RINI08	-----UUACGUUUUAGGCUUCGAGACACUAACGGUUAUCAGUAUC-----
RE0123	-----GUGUCACGAGUUUAGUGACUUUAACAGCAAUCAGCGUGU-----
RE0205	-----GAGUUUUGCCGCGUGAGAAUAAGAGAGAUACACUCAUCU-----
RE0623	-----AGCAGGUGUGCCUCGACACAACCAAAAAGUAAAACGGUG-----
RE0503	-----AACGUUCCGCGUGAGAGUC--UCAUGGCGUACAAACUCGGG-----
RE0532	-----AUAUGC-ACUGACAGCACCGAUGAUAAUUUCCACAGCGG-----
RE0304	-----GCGAGUUUGGGCUUCGAGUUCGA--CUGACAGAAACUCCGCG-----
RE0318	-----GCGAGUUUGGGCUUCGAGUUCGA--CUGACAGAAACUCCGCG-----
RE0811	-----GCCCCUGGGCAGCGGGAUCGCAUCCUUCGGACACUGCGCG-----
RE0201	-----CGGAACGAGUUAAUACGACGUUGUGGAAUUCUCUCGCUUG-----
RE0426	-----UGCUUAGUACGAAGACAUGGGAG-CGCCCCGUUAAACUUGG---
RE0528	-----CGUGCUAUUUGUUCAGUACUGUAAAAUUGGCGCGCGUGG-----
RE0725	-----CGUGUGAUUGAUAGAGAAGUAUACCACGGAAUCGCCUGG-----
00RINI13	-----UCCCGAGAGCCCUU-CGUCCAGAUCGGUUAAGUGA--CUAGUU-----
00RINI24	-----UCCCGAGAGCCCUU-CGUCCAGAUCGGUUAAGUGA--CUAGUU-----
RE0515	-----GCGACACCCUCUGUGACCAUGGCGAUUACCGGAUCCUGGG-----
RE0333	-----CGCGCGGGCUCUCUUGGCCUAGAUCGGAUGUACAG-CUUGG-----
RE0619	-----GACAAAGGGGUCUCGAAGCGAGAUAGGUGGUA-AG-CUUCG-----
00RINI14	-----CCGUGUGUGGGCGUGGUUAUUGAAUUCGAGAUAAUGGCUU-----
00RINI30	-----CCGUGUGUGGGCGUGGUUAUUGAAUUCGAGAUAAUGGCUU-----
RE0427	-----CGGGCGUGGGUACUUUUUUCGGGCUUCUAAUGUCUGGG-----
RE0823	-----GCGUGUUCGUCACGAUUGGGUUCGAAGUCUAUGUCCUGG--
RE0231	-----ACUUGAGGUUUGCACUUUAUCCAUAAGACUCUACGACGGG-----

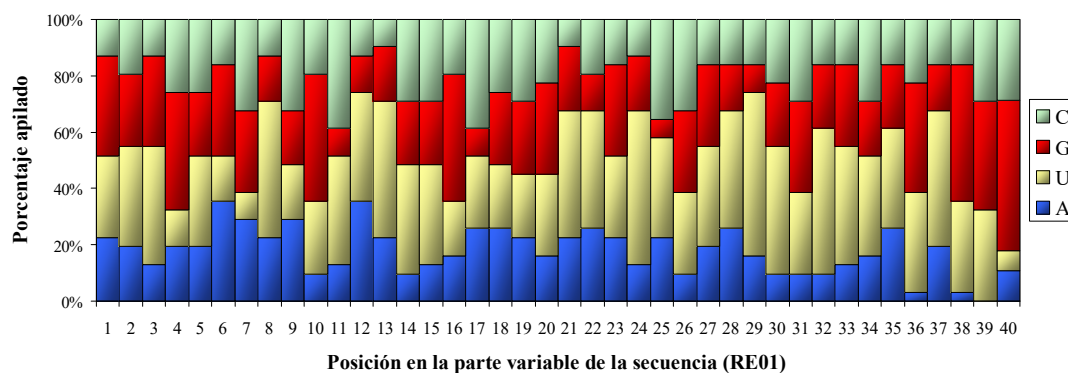


Figura A25. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 1 de la evolución de aptámeros de RNA (RE01).

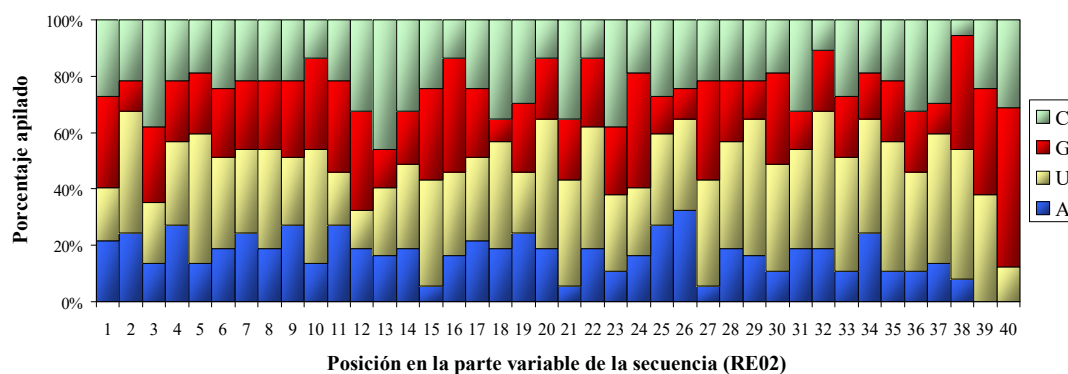


Figura A26. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 2 de la evolución de aptámeros de RNA (RE02).

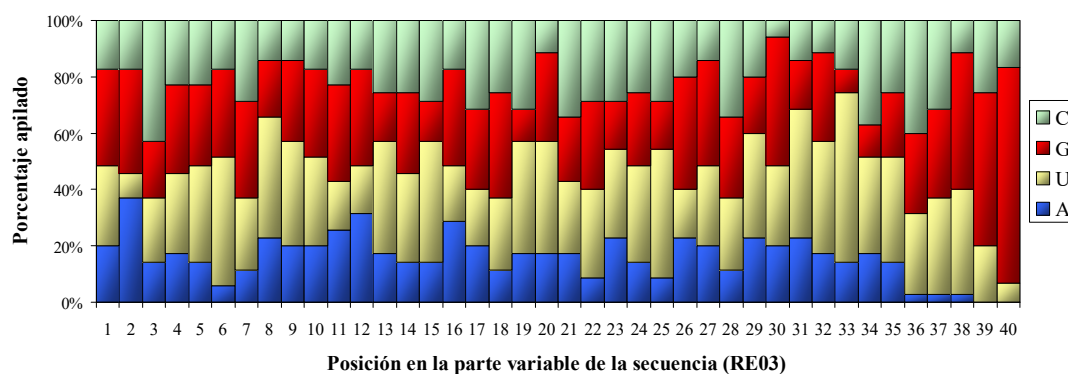


Figura A27. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 3 de la evolución de aptámeros de RNA (RE03).

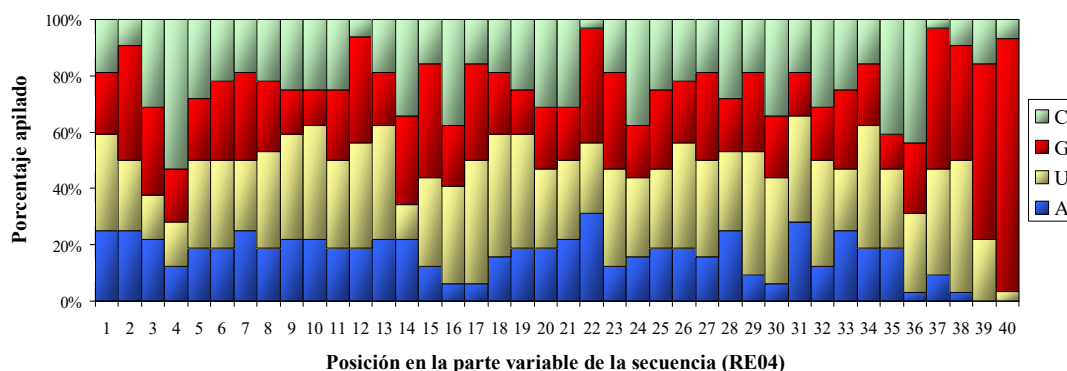


Figura A28. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 4 de la evolución de aptámeros de RNA (RE04).

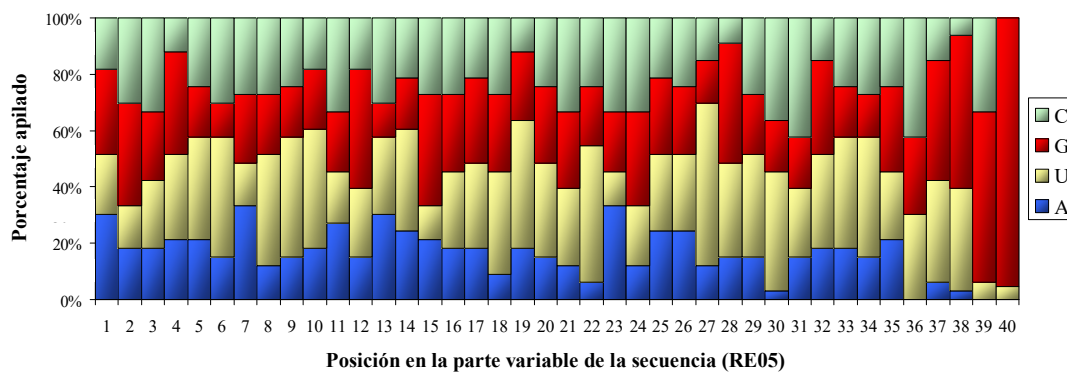


Figura A29. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 5 de la evolución de aptámeros de RNA (RE05).

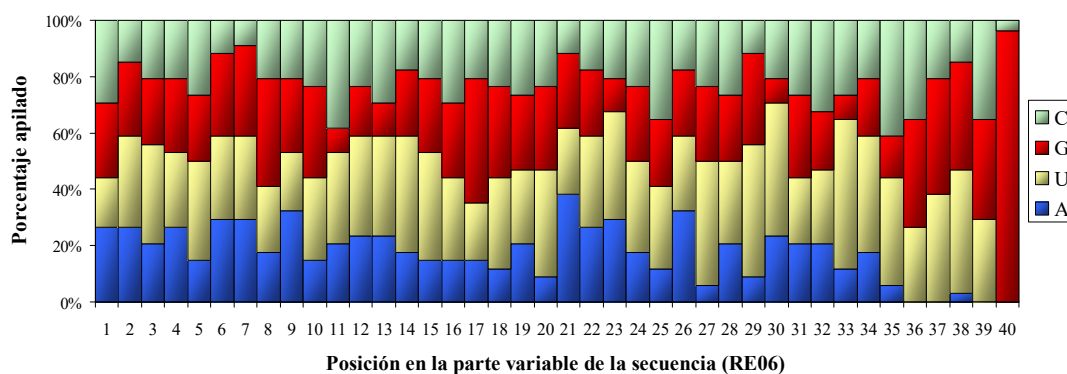


Figura A30. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 6 de la evolución de aptámeros de RNA (RE06).

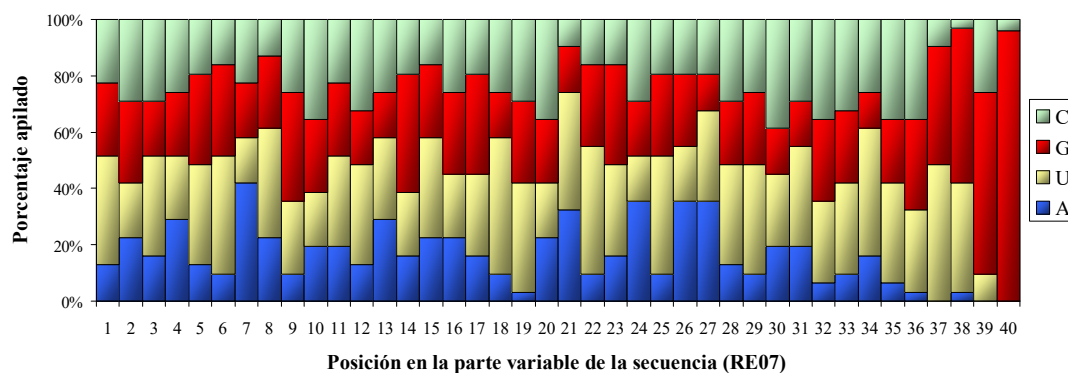


Figura A31. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 7 de la evolución de aptámeros de RNA (RE07).

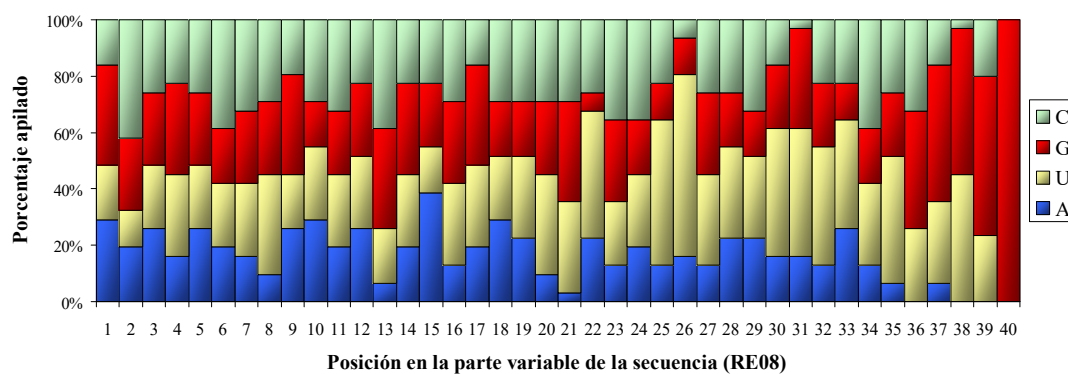


Figura A32. Porcentaje apilado de la presencia de cada nucleótido por posición en la región variable de las secuencias de la ronda 8 de la evolución de aptámeros de RNA (RE08).

Tabla A5. Alineamiento mediante ClustalW de las secuencias obtenidas por clonaje molecular de las PCRs de la población combinatorial inicial (00DINI) y de cada ronda de todos los procesos, DS, RS, DE y RE. El alineamiento no incluye los nucleótidos correspondientes a los cebadores. Los dos números finales del nombre de la secuencia hacen referencia al número concreto del aptámero individual clonado.

Nombre	Secuencia 5'-3'
00DINI04	-----TCAAATGCAATCATGCTGGGACCGGAGGTGTTTGCTATTT-----
RE0717	-----UAAUAUGCCAGCCUAGUGAACCGGAGCGCCUCCCGGG-----
00DINI02	-----GACTGATGAGCCGGT-GTGTTGTGATATGGTATTATTAGT-----
DS0104	-----AGCTGATACGGAGGTGTGTTGTCACTTGG-GCGATCTGTT-----
00DINI10	-----TCACGGTGATTGTCGTGCTCATTTTATTCTTTGGCTAGCT-----
DS0830	-----ACCCATGCTGCCTGT-GAGTTCAATTTTATTTATCCTAGT-----
DS0416	-----CGGAGGCACAGGGTGCCTGATGCACGTTTTGTTTGATGCG-----
DS0417	-----CGGAGGCACAGGGTGCCTGATGCACGTTTTGTTTGATGCG-----
DS0512	-----GGTGAGTTGGGTTCCTATTTGCCCTCGTGGTTGAGTGCGGG-----
DE0722	-----ATCTAGTGAAGTGTATTAAAGAACTCCTTTCATCGTG-----
DS0723	-----GGCTCTCTCGTTAAATGAGGTTCAAGTTTCGCCTTTCTAT-----
DE0204	-----ATATACGTGCGGTGTGAGTAGGGTTCTCATTTTCGTCGTTTC-----
00DINI27	-----GTATCCTAGGTAGAGAGCGAGAAGGGAGCTCGCTTGTTTC-----
DE0108	-----TAAATCCTCGGTAGGCT----GATTGAGGCTCGCCTTGTTTTC-----
DE0509	-----ATATGTGACCTACCTTGTGAGACGGCCCTTATTCTCTATT-----
DE0611	-----CCCGGTGGTCGGTATTGCGACGTG-CTCTTGATCTCTCTA-----
DE0523	-----TGTGTAATCGTTGAATGAGGTCGGCACTTTTTTCCGCGG-----
DS0225	-----AATT-TTTAGCGCAGTGAGCGGTTATTGCGGGCGGAAGTCT---
DE0826	-----GTGACCGGTGAGCTCATTGCCGGGTGACTATTTTTTCCTA-----
DS0706	-----AATTGTATCTGAGGTACTGGC--GGCAACTTCTATTTCCACG-----
00DINI08	-----TTACGTATTAGGCTTCGAGACACTA-ACGGTTATCAGTATC-----
00DINI28	-----GTGTTATGAAATTATAGGCGTCTCGTAACTAGACGTTTA-----
DS0329	-----GGCCTGGCGTACTAATGATGGCGGCTCCA-AAGTTTCTACG-----
DE0125	-----GATGATAA-GCATGGGTTGACCTGGCAAAC-GTCTTCCTGAG-----
DS0222	-----ATAACGTATTTGCTGGCCGCGCAATT-ATTTTCTCTGTTC-----
DE0211	-----GCTCTTGTTGGCTGGTTAATG-ACTTCTCTTTCTTGAAG----
DS0306	-----GTAGGCGTCCTTGATGG-TGGCTCGT--ACTTCCCTTTG--TGAT----
00DINI25	-----GTATC-CGTATCATGATTGATCGTTGCCGGTTAAAGCGTT-----
DE0224	-----AGAAGGGCCATCATGTATTATGAGTCAATGGTT-CCGGTCC-----
DE0809	-----GGTTTCCTTACTGAGTGGCGAGCGATTATAGTTAAATGT-----
DE0822	-----CGTATACTCACTGT-TAGTGGCCGAGGGTTTTTTGTTC-----
00DINI01	-----TAATCCAGAACTAGCCCTCCGCC---CTCACTTAATGATGTGT-----

8. APÉNDICES

DS0126	-----GAGCTGTGCACTCAGCTTCAGCG---CTAA--TAATTATGTGTCG-----
DE0410	-----TTGCACTAGGACCCAGCGAGACTCAG-TAATTGTTGGTTAT-----
DE0624	-----ATGCCGCGACTAGTCATTATACTTCGCCTATCCCCGACTG-----
DS0404	-----GTCGAGACGCCGCTTATGGTTGTAGACTCCGTCCGTCC-----
00DINI12	-----TCTGCAATGGAAGTACGCGCCTCAC-CGATTCTGTTCAAT-----
00DINI26	-----TCTGCAATGGAAGTACGCGCCTCAC-CGATTCTGTTCAAT-----
DS0129	-----CTTCGCTACGGCATGCGGCCGCTCAC-CCTTTATTGGCAA-----
00DINI40	-----AGTCGCTTTTTCTAACTAAGA--CCGGAAATTCGTTTATGGT-----
DE0726	-----CGCTGCGGATTACTACAGACG--TCCGGCAGTTCTTTATTGT-----
DS0209	-----ACATCTTCGGATAAAGAACACGCAGCTTCGCCACTTCGCA-----
DS0507	-----CAGGAATGCGCCAACACTACTGCTAATG--CCCGTAATTCGCC-----
00DINI17	-----CCGGCATGATCGTACATCTTTTGT-GTCCTCTTCATCACC-----
DS0411	-----CGGGGCTGCAAGCTGTAACATGCCGTTGTGCCCTCTCCCT-----
DS0605	-----GCAACCCACTTCCGCAACCGGCAGCGTGGAGGTGTATGCG-----
DS0731	-----CGCTTTCGGCGCCCCGGGATGCTGGTGATATCTGTATGGGG-----
DE0113	-----CCAGCTGCTCGTAAACGGTGAAGTTAAGGTACGGTCGTTG-----
DE0122	-----GGTGGCCCATTCGTTGCAACCAAGTGACGCAACATTCCGGT-----
DE0126	-----TATGCTTGCTCAA--ACGCTGC-TTGAAGCCGCTGCCATTGG----
DS0109	-----CACTTGAAATGCGTGATCAAC-ATGCGGT-TTGCAGTCGATG-----
DS0503	-----AGCATATGCTCTCTTAATCGCGGCTACTTCACCCGGAATG--
DS0813	-----TGAGTGAGATTATATGATTGAATCGCGCTGCT--ACCCTG-----
DS0818	-----ATCCTTCCACAAGCCATTTTGTGACCCGCGTGTCT---CCTA-----
DE0832	-----AATGGCACGCGGCGACTCCGCCACATGTTTGATTCTCAAG-----
DS0320	-----GAGCATTCTTAACGACTACTACCGGACAGGGTCAATTCCGC-----
DS0604	-----AGTCGCCTGCCCCAGGATTTTTTCAAGTGCCGTTAACTTT-----
DS0810	-----TCCGGCCCGTTGGTTTTTTTCAGTTACATTTCACTATGGG-----
DS0323	-----CGACAAATCCGG-GTTAATGCTCGTTACACGTCCTCTC-TGT----
DS0617	-----ATATCCAGTGTCATCATCCATGCACTTGCAATCATGAGG--
DS0113	-----AGTTTTTTTACGCGGCGAG-GCCAATTGTCAATACACATTA-----
DS0116	-----CATTGAGGCTTTTTGACCGGCGTCAAAACTGCTACGTTT-----
DS0712	-----GCGACGCGTATCGGCAAGTATCAATTACCGCTGTTTTTCG-----
00DINI21	-----TTTCACAGTGCC-CTGTATATC--GCTATGCAATCCCCGGCA-----
DS0812	-----TGTGGTCACATATGTCTCTGATTCTC--TCCATGCCACACACG-----
DE0527	-----GTCATATAACGCTAAGGTTTTCCAAGTTTTACAGTTTTTTG-----
DE0825	-----CCCAGACAAATGCTACGCTATTC--ATATTATAGTTTCCATGT-----
DE0729	-----GTTATTTTACAATT-CTGCCCTCTTT-ACATAGGAAGGAACG----
DS0627	-----CAAACCTCTATCGTTCTACAGTG-CCCCTATTTCTCACATA-----
DS0105	-----CGTGTCTATCTGGGTGTACAACG-CCGACGCTTTTAAGGTG-----
DS0220	-----TGTCGGGTTTATTACTTCCCACTCTGTCAACATGATGCC-----
DE0403	-----TTCTCGAACTATT-ACACTTTGACTATTTACCTGCACTATT-----

8. APÉNDICES

DS0513	-----CGATTTATTCGCACAACGACAATTTTCCCATAGGAGACAC-----
DS0213	-----ACCGGACTGATCTACAATTTCCATGGAGGTCACTGCGCTC-----
DE0704	-----GGGTGCTATGGGTCTTCACACGAAAATTTGCTCTCTACTG-----
DE0712	-----GGCAGAGGCAAAATGGGTATTCAATCTAACAACCTCCCTA-----
DE0206	-----TTCAGTGCCTGTTCTGGCGCTGTGTAGCCCGTTTGACGCA-----
DE0803	-----GCCAGTGTTTCTCTCCGTGTTCGCTTTGGACGGAATTGG-----
DS0615	-----AGAGTCGCTGCTGAGTGCTACTTGGTCCTTAAATGGAGGG-----
DS0801	-----GCGTGTGGCTCCCGCGTCGCAATTCGAATTTAAACATTTTC-----
DE0212	-----CGTCGGGGTAGGT-AACATTTCGATTTTCGGCCCTACCCTTT-----
DE0528	-----GGGTCTATGTAGGTGAACCATTCGCATTTTATTATGTAGT-----
DE0419	-----TATCCGAG-ATGTCGAGTTTCTATATTTAGCCCTAGACTGT-----
DS0316	-----GTACAGTGCTGCTTCGCTGAAGGCGTC---ATTCTGATATACG-----
DS0819	-----TGCTGCTGCCCCGTTACGCGT---ATTTCAGATCTACAATGCCGT-----
00DINI35	-----GTCTCACTTCTTATC--TACT--CGGTCATGCTGTTGGACAGTG-----
DE0810	-----TGAATTTATCACC--AATTTTCGCTCATTTTCACTCGTCATG-----
DE0326	-----ATGAACCTTATGCCT-TAACGTAGGCTAATTTGTATCTTTGG-----
DS0715	-----ACGAAATTACCTTAGTAGCGCAAATTACTGGTGATCTGTTG-----
DS0811	-----TGTCCTCC-GAATGTGCGCTAATTATTAGTTCTCGGTGTGT-----
DE0603	-----GTGTGGTTTTCTTTCTCTCAAT-TACGCGCTACATGGTTAT-----
DS0719	-----ACACTGCCTTTCTCCCTCAAC--ATGCGCTTAC-CGTTTGTA-----
DE0123	-----GTAAAGAGACACGGCGACGTCGTTTACTTCCTTCCTCTTC-----
DE0813	-----TAAAGCGCTAGCTCCTCTATGTCCCCCTTTGCAGACCTA-----
DE0818	-----TGTGTTGTTCTGCTCTCCGTTTCTCTTTTATACTTACGCTTT-----
DS0820	-----GTGGTTTTTCATGGCCCTATCTATTC---AATCACTTTTACG-----
DE0327	-----CTCAATGCTGCCTTTCTCTGACGTACCCTTTCTTCCGCGT-----
DS0409	-----TATGCCTTTAATATGTCTTACTACCATTCTTAACAACACC-----
DE0804	-----GTACTTGTTTCAGTCCTACATCATACTCATACTTTCACACG-----
DS0402	-----CGATGATCATTTCTAC--CATTCCTACCTTCGCTTTTTCG-----
DE0604	-----TATCTTTCTATACTATTCAGCAGTGCTTCCCTTGCCCTTCA-----
DE0622	-----TATCTTTCTATACTATTCAGCAGTGCTTCCCTTGCCCTTCA-----
DS0201	-----ATCAGCCGATAATGCGGGCGCACCTTTCTCATATTACACA-----
DS0423	-----AGTATTATTCGATGATGCTTACCCTCCCTT-TCACACCTCC-----
DE0101	-----CGTC-GAATATGGGTA--AATTTTCT--CTGTATATCCAGTCT-----
DE0316	-----TATGTGCGTA-GTACACGGCCA--ATTGTTCTATCTGTC-TATC-----
DE0104	-----TTGGCGTATGTACATGGCAG--AATCTTTCACCTTCTCCTTG-----
DS0718	-----GTAGACGT---TGCAGGGCAGTCAATTTTTCGCTTATTTCTG-----
DE0725	-----AACTAGTGCTTCCAAGATTGCGATTT-TTCTCTCGCCGGT-----
DS0108	-----CATCTCCGCTCCCTCGTCCGCCATCTCTTCTCTCGTTGGG-----
DE0802	-----ACTAATGCCTGCAATCCTTCGCTTTTACCTCCACTTTGA-----
DS0430	-----AGAAGCATGCGATT-TCCGCCTCTT--CTCTGTCCTGACCATC-----

8. APÉNDICES

00DINI19	-----TCTATGTGTCTACATTTTCGTCCAGCGGGTTGAGGCGGTTT-----
DS0529	-----GACTGGGCGCCTACATAGGCTTCGTAACGCTGT--TTGTTT-----
00DINI03	-----CCTATCAAC-CGTCTTTCCTACTGGATTGAGAAGGGTTTTTCG-----
00DINI37	-----ATGATTGCTTCATTGAACTAGTAACGGTTTATGGATCGGT----
DE0402	-----CTACTTATGCGTGCATTCCCTAGGATAGTAAGCCCCCCCCA-----
DE0219	-----TACTTTTCTCGCCAGGCTATGGCTGGATCATGGTACCTGT-----
DE0231	-----GTAAATTCTCTGG--AGGCTATGGTTGC-TAACCGTACCAGT-----
DS0204	-----ATGTTACATTGTTTCCA-TGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGT-----
DS0210	-----ATGTTACATTGTTTCCA-TGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGT-----
DS0227	-----ATGTTACATTGTTTCCA-TGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGT-----
DE0709	-----ATGTTCCAACGCCTTGGGTCTATTAATATATTAGC-CACAC-----
00DINI18	-----TCACGCGCAGTTTTTCTCA-TAGGTACGTGGCGTCTGAGAG-----
DE0313	-----AGCACACGTGCGTTCATGTTTCAGTAGGTAGGTAGCTGT-----
DE0623	-----TGAGTTAATGTTCCATTTCGATTAGCTAGTTAACAAAACCTG-----
DS0828	-----TAGAGTTCGTGTGGCCTTTGATCACCTATTTCAGCTCTGTG-----
DE0305	-----TGGGT-TGCGTTTG-CTTGATTGTACAGTGCATTATTATTTA-----
DS0431	-----CAGAGTATGGGTTGGGCGCGATAGTAC--TGCATTAAAGCCG-----
DS0427	-----AGAATCCCTTTGGTAT-ATCGTGCATCCCATGGGCTGCTGT-----
DS0702	-----ATTTTGGTTC-ATTG-GCAT--GATTATCTGCTGAACCCGGGG
00DINI23	-----GTCGACCTAACTTTAAGCTGTTGTCTATAAATATACCTCG-----
DS0324	-----GTTTGACTACCTATCTTT--GCTGATGACGGTTTGCTTTCCC-----
DS0317	-----TTGGGATGCACGCTG-CCGTAGACTACAGGACTTACCTCTC-----
DS0328	-----TTGGGATGCACGCTG-CCGTAGACTACAGGACTTACCTCTC-----
DE0207	-----ATACTTGCTG-GCGTGTAATAATAG--CTTATTTCTGAATTGGA-----
DS0609	-----GTATCACAGTTGTTTCGCTGTATATAGCTCACATCTACCTG-----
DS0610	-----TCTAGATGACGGTTGGCCAC-GAACACAGCTCAAATCTGCG-----
DE0124	-----GGTCTGCTTTAACCTTGGC-TATTT-CGGTGTGGCACTGTG-----
DE0303	-----ATGCCTACGTTTACCCCGACATCATT-CACTGTTG-CACTTA-----
DE0401	-----ATGCTAATCACACCTTCAC-TTTGA-CGATGTTCGAACGGAG-----
DE0620	-----TGTAGTTCTTGGATTGTGTGCGTTTTACCAAACCTCGAG-----
DS0407	-----TGCTAAACCCTTTGCTTTTGTGGGTTGCTCCCATATCACG-----
00DINI06	-----TAATGGGTGGAAATGGTATTTCT-CTTGGTTGTTTGTGCTCT-----
DS0815	-----TGATGGTACTATTTTGTGACATGTTTGTCTTCTATC-----
DE0225	----ACCGAACCTTTGTTGATTGTACTCTGGTTCACCTTCGGGC-----
DE0715	-----TTGGAGATGGTA-TCTATCTGAGTTTCTGGTGATCTCTCTT-----
DE0127	-----TGAAGTTATAAGATTGCTATATTCGTCCGCAGTTTCCGGA-----
DS0827	-----ACGTATATAGTAGATTTTTTTTCTCTCTACTAACCACGG-----
DE0515	-----ACAAACAGCAAACA-TAGATTAGTTACTTCTTCCCTCCCTC-----
DS0217	-----AGGATGTCCAACCACTTGGTTGGTGATTTCTGTGCGCCCT-----
00DINI32	-----AAGGTTTAGTT-CTATTTACATGATGGGTTTTCTTTTCGTG-----

8. APÉNDICES

DS0614	-----AATCAGTTACTGTTTTCTGCTCGGTTCTCATTTAGAGGG-----
DS0123	-----TAGTGCCACCTAT-CTCAGGAGATTCAGTGTGC-CCGTGTTT-----
DS0125	-----GCGTCATAGTTGCTCAATGGCTTCTGTGTCTCCGTGCT-----
DE0105	-----ACTGATTATCGCATGTTTCGTCCTCGCGCAATACCAGATGG-----
DS0713	-----GATTGTC--ATGGTTGAATTCCTTCTATACACGCTGGGACGG-----
00DINI15	-----ATCTTAGTTGACAATTCTTCGCTTGCGGACTTCTGACGC-----
DE0314	-----TTAGTCCACGCTTTTTTCCTTTT--ATTTCTGCCGTTTCGTA-----
DE0507	-----GAGGTTGATATCTGTTCCATGCTTATTTCTACTGGTTTA-----
DS0216	-----CGGCCTAATAGGTTGAGA-CTGTTC---GCTTACCTCATCCTGA-----
DE0525	-----GTATTTTTTATCTGTTGATTATTTCCAATCTTATGTGTG-----
DE0829	-----ATCTTTTGCATGACGACTATTTACTAACTTTTCTCTAG-----
DE0710	-----GATTTCTTATTATTCTGTATTTAATCTCGTTTCTTGTATG-----
DE0730	-----TTTGTCTTAGTTACCTATCTATTATATGCTATTCTTT-----
DS0315	-----ATATGATTTTCATCTCTAGAATATTGTCTTATTTATGGGT-----
DS0231	-----TGTTTATTTGACACTCTTTGGGTTTGATTACCCCTATAAG-----
DS0311	-----GTTTGCTGCTCCAGATTATTTG--TTTAGTTTTATTTCCCA-----
DE0430	-----ACGCGCTGGCTATTTGCTGGC-TTCCTGTATTTT-CTTCTGT-----
DS0824	-----AGGTGCTGCTTACTTTTTCTGATTGCTGCGTTGC-GTTCTG-----
DS0421	-----GTTGTTGTAGATATGTTAGT-TTTCAGTAGTATTGCGTCGT-----
DS0510	-----TGTAGTTGATTATTGGTTTCT-CTCCTCTATTA--GCGTCGGT-----
DE0302	-----TCAGGAATATGATTCTTTGTTTCGTCGTTTT--ATTGCCGT-----
DE0629	-----ATATAAGTAAACCCACGAATACTGCACTTC-CAATTTTCGT-----
DE0724	-----TGACTTCCATTCTATCATGTTTCCTTATT-CCGTTGTGACC-----
DS0721	-----GACTTCAACCCTGATAAGCTATGATTTC-TCTTCGTTGTG-----
DS0106	-----CTGTCTAGAATTGTGTCGAGGCACCATATAGCCGCTGTTG-----
DS0717	-----CTTCGCGATTCTTTTAGTTTCACCTTCTCGTTGTTGTTGG-----
00DINI20	-----TACGTTAATTCATGTGTTAATGT-GGACTTATCTGCGGAGG-----
DE0705	-----TTCATTTACAATCCTTCATTTATTTTTGTTGGAGTTTCT-----
DE0801	-----GTTTCGTTTCC--ATTTCTTAGTCTGCTACTGTTATCCTGCCT-----
DE0807	-----ATTTGTTTCCTCAATTCTAATTGTGCGACTGATCTTATGG-----
DE0605	-----ATTGTGTTCAATCGTTTTTAATGAGCGTACGGATCTAGC-----
DS0327	-----CGGTTATTATTATCCAGCCATTATCATGAACTTTGGGATG-----
00DINI33	-----CGCATTTACATGATTTTGCGT-TGTGGTACGGTGTGTGTCG-----
DS0415	-----TTGTTTCCCGTTCTGTTTCGTGTGCGTCACATTGTTGTGTCG-----
DE0511	-----AGGTTTCAGTTTCCCCTTGTGTTACCGTCCTCCAGTTAGT-----
DE0512	-----AGGTTTCAGTTTCCCCTTGTGTTACCGTCCTCCAGTTAGT-----
DE0112	-----GTCATTTATTTTAATTTTTTTTTACGGT--TCCAGTCCTTCC-----
DE0420	-----GGCGGTTTTGTCTTGAGC--TTCATTGTGGTTTTTCTTAGC-----
DE0817	-----TGAGCTTTATGTGCTGAGCCATTTATGTGACTTTTCTC-----
DE0529	-----TGCCCTGCTCTATAGATTACAGGT--TCGTGTGTTCTGCCCG-----

8. APÉNDICES

DS0623	-----TTTGCTGTATAGACTTGTACC-TCGCTCGTAACTTTCTGAG-----
00DINI38	-----CGACGTGTACGAGTAGCGCGTTAGATCAGGTTAACACTTT-----
DE0711	-----GCATCTCCGAGGTACGTCTCATTTTCAG-TTATGATTTTGGT-----
DE0232	-----AATACCTCCAATTTCGAGGAAGGCCTTTA-GTGATACTTCTT-----
DE0617	-----TGTTCCAATTCGGGGTTTGTAGTA-TTAGTACTTTGCTGT-----
DE0821	-----GTTAGTATTTTCGACTTAGTGCTCGTTCATG-TTATTCTGCG-----
DE0823	-----GTTAGTATTTTCGACTTAGTGCTCGTTCATG-TTATTCTGCG-----
DS0219	-----CGGTCTCTTACTGCT--TTTATG-CTATTAGGCGAGCGTGGG-----
DE0806	-----AATCTCCGTCCTCTAAGTTTTTCCGCTTTCCTAATCTGT-----
DS0128	-----CTCGCTAACTCGTTCTGTTTACATATCGCGGAGCGCCATA---
DS0211	-----GCC-CACTAGGAGTTTCGTTACGCT-TT-CGGGATGCGCGTGG-----
DS0232	-----GCC-CACTAGGAGTTTCGTTACGCT-TT-CGGGATGCGCGTGG-----
DS0214	-----TTACGCGATATTTGAAGGTGCTTCACGCTGTT-CGGTCTGC-----
DS0418	-----ATATGTGTTTTTGACGATCGCTTGCCGTCCGT-CATGTTAT-----
DS0729	-----GTTGATTATTTAAGTTTTCTGCCGTTTCGCATGTGTTGC-----
DE0117	-----GTCCTGTCCTTGATGCGATGAGTAAGAT-CGTATCTTGTTG-----
DS0405	-----ACAGCGGTAGTGCTGTGTGTATGT-AAGATACCATCTGCG-----
DE0702	-----GTATACGTGGTATTCGTTAGATGTGATGTGTTTATCTTGT-----
DS0325	-----GT-TACGTCTTACCCACTCGTCGTTGTGTGTTATTCATGT-----
DS0611	-----AT-TGTATTACGCTACCTACTCTTGGTGCTCGTGTTATGTC-----
DE0301	-----AGGAGGCCAGGCGCGCTGGTCA--TATTGGAATT-TTTATGTT-----
DS0112	-----GAGGCAAGTCGAAGTCGCCAGATGTTGGGTCTGTTTTTGG-----
DE0322	-----TTTCCTGGGAGGGCTTGTATGTTCTT-TTACTGATCGTTGG-----
DS0817	-----ATACTGGGCATGCAGGCATGTTGGTGTTTCTGTATGTTGG-----
DE0317	-----GAGTGGATGATTGATGGATTGTTTGGGTTTCTATATTGC-----
DE0227	-----GCCCATTTTAGGCCGTGTATT--CTTGTTGTGTTCTGCTCCC-----
DS0406	-----TGGCCATCTTGTGCCTGAAATTGCCTTATCGTATTCTCTT-----
DE0103	-----GCTAGCCAGCAGGTCCGCGCGCTTTGCTTATTTTAATCTG-----
DS0518	-----GCGGTTACGGCTGGCGTAAATTCCTCGGTTAGTGACTCG-----
DS0710	-----TTTCAGACCAGGTCGGCTTGTGGAATATTTTCGCATGG-----
DE0119	-----CTTTTCACACGTG-GTCGTCCCGCTGGTTGCTCCGCAGTG-----
DS0305	-----TGGTATCTCACACAGGTGTCAGCGCGCAATTTGCGTATCG-----
DS0307	-----ATGTGTGAATCCTTCC-CAGGTGCCCCTTGTGATTGCCC-----
DS0616	-----AGTCAATACTTCCACGGGTTCTTCATATGTGATTAAGTGG-----
DE0215	-----TAGAGGTAGTCTTTTTACGCTTTCACGTGTGTGGTTTTT-----
DS0121	-----GGCGCGTGTTTTTCCCATTGGGGTCAGTGTTATACTTGTT-----
DS0403	-----TCTATTTGTCTATCTGAGCGTGCCGCGTATTTGTTCCGTT-----
DE0203	-----GCAGTTACTTTTGTGTGTTTAGCATTGGAATAGTTCTGA-----
DE0619	-----TGCCTACCGGTGTTTCATTTTCGCTTCGTATATCTCTCTGTG-----
DE0226	-----GGCATGAATAGGCAGGTCATCTACGCTTTGGAATTATCA-----

8. APÉNDICES

DE0422	-----TAAGGGTTTTGATTAGTCGGGGCCTGTTCTTTTTTCGTGT-----
DE0713	-----ATCTAATTTCAGGTCCTCTCCGAGT-TATGTATTGGGGCT-----
DS0618	-----GGCCA--CTTCAGCTCCTTTTTGTGTATGTGGACTGTTACCT-----
DE0306	-----GAGCAGAGGTTCGGCG-TCG-CCTTGTTATTTGTATTTTA-----
DS0711	-----GGTTTTGCGATCG-CTTGCCGATTAGTTTTTCTTCTTTGCC--
DE0425	-----AGAAAATTAAGCGGTCGGCTGTCTCATTGGTTTTGTTCCC-----
DE0811	-----GTCAGCTAATAACGCTCTCGAC-ATTCCATTTCTCTCGTTG-----
DE0319	-----TGCGGGTAGC-CGCTTTCGCCCTT-CATATTATTTCTCCCGCG-----
DE0720	-----GCGTTTGGTTGCTCTTCGCGTTGCATGTTCCCTCCCTG-----
DS0730	-----TGTCTGGTGCTTCTAACCCTTGATGTTACTTTTTTGCC-----
DE0320	-----TGGGGCCT-CTGGTTCTCTCCGATCCGTTTGTTCCTTCCG-----
DS0622	-----TCTCACTGGGACCGGCTGCCTTCTCTCA-CAATTTGTTTCG-----
DE0323	-----TTGTGCTG-TGGCATTGCTTCGCTCACGTTGTTTCCCTTA-----
DS0727	-----GTGTGCCG-GGCCCCGTTTTGTGTGCACTATTTTTCATTTAT-----
DE0414	-----TCTCTGTGAATAAGTTCCTTGATTGCTCTCTGACCATGT-----
DE0834	-----AGTTCTCTCTGTGTCAATTGT--TGATT-TTCCCTGCTTTTTTC-----
DE0118	-----TTGCAGCGGGTTTGTGCGACCATTCGATTACATTGTTCTTA-----
DS0410	-----CTCGCAGGGGGTTCGTCATTTAGACCACGGTGTTTTGTTC-----
DE0530	-----CTTTCGATTGGG-CATTGGCGTCCTTATATTATCATGTTTCG-----
DE0406	-----TTTTGTGCCGCCGAAGGGTTTCT-CTTTGTAAGTGTCCCTAT-----
DE0408	-----TTTTGTGCCGCCGAAGGGTTTCT-CTTTGTAAGTGTCCCTAT-----
DE0429	-----GTTCTGCAGACTGAGCTTTCGACTTCGTAATTTTACACC-----
DE0716	-----ACTATACGACACAATTCAGGGTTATTCGTTTTTATCCCT-----
DS0701	-----CCATAGGCTATACGCCACCGTT--ATGTTATGTGTTTCTTCC-----
DE0205	-----GATAGTTTCGGC-TGCTT--TCGGTTGTGTTTTATCTCTCTCT-----
DE0602	-----GTAGATAGTCTCA-C-TATTTACTCCGTGGAGTTGTTTTTCG-----
DS0707	-----AGAAATAAGACA-TATTTGTGTGTTAGGCTCACTCTCATAT-----
DS0708	-----AGAAATAAGACA-TATTTGTGTGTTAGGCTCACTCTCATAT-----
DE0304	-----TCTAAGTTCGGCG-TATTTG--ATTTTACCACTCTCTTTCTA-----
DE0413	-----GCCCATTTATCCTTGAAT-GCCTACGCCTCTTTTAGTTTTT-----
DE0519	-----CGCTATTCTTGAATTGATTACCCGATTCTGTATTTAAGG-----
DE0524	-----TCCTAGTTTAGCGTCGATTGTTACGCCGACGTTTATTATG-----
DS0515	-----AGCGGTGTCACT-GCTTTCATCGCTGTTAATTTCTGGGAGT-----
DS0519	-----TAGTGTAAGT-TGCATGCGTGATATTAATCCACTGAACCTG-----
DS0603	-----ACTTCACCTGTTACCCGGCTTCTCCGTGATATGACGTT-----
DS0832	-----TTACAGCCCCTGCTACG-GGTTTTATGCGTGTTACTTTTGT-----
DE0318	-----TTATTTCCCT-GGGTTCCTGCAGGCCCTGC-TTCTACCCCGG-----
DS0621	-----CGCTAATGTCCATCGGGTTTTTGGTGGACTTCGTTATTGG-----
DE0421	-----AGGGTGCCAGCTAGGGTAGGT--TTTTTTTTTCCCTTTTAC-----
DS0412	-----GAGCTCAGCTAAGACAAGCGGGTTTTTGATTCTACCTCGG-----

8. APÉNDICES

DE0405	-----TAACATCTG--AATTGTGCGAATTCTTCTATGTCCATCCTAG-----
DE0426	-----TAAATGTACATTTGGTAATTGTGCGTGTT-TTGTATTCTTA-----
DS0229	-----GATGACCCCGTCAATATCCATGCGGATGTGTGCGTGTTCC-----
DS0230	-----GATGACCCCGTCAATATCCATGCGGATGTGTGCGTGTTCC-----
DE0707	-----TAATGTTAA--TATGGCTACGGGTG-ATGTGCCTTCTACCTCG-----
DE0812	-----TGACCATGGGTATATGTCGATTGGCT-ACGTCTAATTTAATG-----
00DINI05	-----TTACCCTTATTCTCCCGGATTCTTCGCGCTTAGGTCCTGT-----
DE0505	-----CTATTTTAGTCTAACTGGATGTTTCGTTATAATGACCTAG-----
DS0206	-----GCGTATTACGTTTGTTGCGTATATGGCCTTTTCTCTATAT-----
DE0208	-----GACCGTTTTATTGGCATATCACTGAAAGTCTC--TGCATTAC-----
DE0307	-----TACGGTATATTCTTAT-TCGCGTAAAGTCCCATGCATGTG-----
00DINI14	-----CCGTGTGTGGGCGTGTTATTGAATTCGAGATAATGGCTT-----
00DINI30	-----CCGTGTGTGGGCGTGTTATTGAATTCGAGATAATGGCTT-----
DS0620	-----ACAACACGCGCCTATGTAGGC----TTATAGACTTGGAGTCTG-----
DE0213	-----CGGCGTTTAGGTTAAATTCGTGT-GATTTTTATCGCATT-----
DS0120	-----GCGTACAAATCTCCTTAACTTAGAATCGTATT-CATTTGTA-----
DE0805	-----ACTTTTTCGCCCCCTTTAAAGTCTAATTTACA--GAATTGT-----
DS0111	-----TTTAGTCGTCCCATTTAAGGTCGTATGAGTGATGGGTCGA-----
DS0103	-----AGTCAGAAATCTGTTAGGTATAATATTCATCGAACCTTTA-----
DS0814	-----ATCAGAAGTCTTT--ATATACTTAACTTTGAATCATTTGTTGG-----
DS0310	-----CGCCTCGGCATTCTAGTTGGAATA-GGACCTCTATAACGCC-----
DS0508	-----TATGCGCTACGCACTGTGTAATCTAGATTAGTATACCCTC-----
00DINI34	-----TATTGTAT-TTTAGATATTTTGAATCCGAGTTTGTGCTATT--
DE0628	-----ACTGTATTGTTT-TAGTAAGTTATTTAAGGAGTGTTAGTGG-----
DS0720	-----ATCAGTATATTAT-T-TATGTTTATTTTCGTACCTGAGTCGGG-----
DS0318	-----AGGTAGTGTGCAGTAC-TATCTTTTATGCATTCCGCATTT-----
DS0501	-----CACACGCAGAACCTGTAATTATGTACAATCCACACCTGC-----
DE0508	-----TGCCGTGTTTTTTAATGTATA----ATAGTTATGTACAGAACGT-----
DE0717	-----TGTGTTGGTTAGAATATAGC--ATAATTATATTTTTTAGTCA-----
DE0609	-----ATGATGAGTTCTTTGCTACTATTTTAGCACCTATTTTCTA-----
DS0426	-----GTATACTTAAGTTTTTACCTCCGATTATACTCCTATACCG-----
DS0612	-----TACTCTCTGATAGTGAATACATAGATAGTATTTTACTACG-----
DE0308	-----GCTTACCTTCCCTATTGAATA-ATTCGCATACACTCTGGTG-----
DS0714	-----AGTTATGTCACCTGTTGCGAATATTATCATTTACTTCGGG-----
DE0409	-----GGTAATTAGGTTATATTCTGTCAAAATACGACACATTAG----
DS0629	-----CCTAGACGCTATAAATTGCGGACATTATTTGAAATTACGG-----
DS0122	-----CGTGGGGTACCGTGATCAATAAGGCCCTTTATTTTCATTA-----
DE0412	-----GGAGATACGTGTCTAATCCATTTGACCCCTATTTTTTT-----
DE0706	-----TGAGCCTGCGGACGTAA-CGATTAAAATTATCTCCTATCGG-----
DE0526	-----CCTGGTAGTTATGTAAATTGGT-TTCACCGTTGATTAACCG-----

8. APÉNDICES

DE0719	-----CATTCGATTTACATAAAGCGTTATTCCCCGTTATTTAAGT-----
DS0312	-----GCTGACGGATATTTTAAT--TGAATCTCGTTTTTCCTCGAAA-----
DS0606	-----GGGGAGTTTGGCAGTAATATAAATCATGAATCTCTTATTGC-----
00DINI42	-----GATATTATATA-TTGCGTGAGATCGATACTCGTTATCGTAT-----
DE0615	-----TGTGCCAAGGTTATAT--TTACATCTAAATCATACTCCACA-----
DE0521	-----CTTTTACTTTTCTATTGTGTCAGATGTATTCTGGCCCGAC-----
DS0221	-----TGCCTTTACTATCTTCATGT-TCAGGTCTATA--GCCTCAGCC-----
DE0321	-----GGGTTGGGCACAAACGCGGAG--ATTGTCATCTGTTGTTTCC-----
DE0816	-----GAATGCTGGGGATATACGTAGGGTGACCTCTATCCATTGT-----
DE0417	-----GCCGTTGTTCTTGATTATACAAGGCGTTGATA-TCGCCCT-----
DE0830	-----TTGCTTTTGTATTTTATTAT--CAACTGTGGATAATCGCCCT-----
DS0528	-----TAACATTTGTGTAGATTAT--CCTGCGTAGATA--CGATACTA-----
DE0517	-----TATGTAACCTGGGGTTTGCCTAG--ATTATTTGACT--CGAC-----
00DINI07	-----GGCCCGTTAACCGTTTCGTAGTGATA-AGATTGGTTA-TGGTG-----
DS0625	-----ATTTACACATTTGTACTCATGCAAATTGGTTG-TCCTGGTG-----
DE0230	-----TCCGTTGGGTATAGGCGTACGTGCTGATTAGTGTGTTAT-----
DE0601	-----TAGTGTGCTTTAGTCGTATTTACTGGTCA-TGTTGTTAAGG-----
DE0708	-----GCTCGGGTGTT----TAATTGCTGTAAAAGTGGTTCGTTTCATA-----
DE0723	-----GCTCGGGTGTT----TAATTGCTGTAAAAGTGGTTCGTTTCATA-----
DE0833	-----TGAAGCGGATTTC----TACCTATTTTAATATT--TTCGTTCTGCG-----
DS0314	-----GGGACTTCATGTTAAATGGTTAGTTTAAAATCTGTCAGC-----
DS0602	-----ACAG--TTGGCTATGTTCCGGT-CAAAGTTTAATATTTGTGT-----
DS0808	-----ATTGCTTTTGTATGTACAGAAGCGTAGTTCATATTCT-----
00DINI13	-----TCCCAGAGCCCTTCGTCCAGATCGGTTAAGTGACTAGTT-----
00DINI24	-----TCCCAGAGCCCTTCGTCCAGATCGGTTAAGTGACTAGTT-----
DE0222	-----TGGTGTCATTGAGAGACTTACATGTAGTGCCGTGAACCTA-----
DS0322	-----GTCACAGACAATGATTGTTTGAGTGAAAGTACTTAG--GTTA-----
DS0326	-----GTCACAGACAATGATTGTTTGAGTGAAAGTACTTAG--GTTA-----
DE0312	-----GGAAAGACATGTATTGT--AGTGAAAATCTTCATCCGTAATC-----
DE0415	-----CCATGGTCACTCTTC-TGTTGAAAGATTGTAGTTAATGGA-----
DS0630	-----GCGTAGAGGTTCTTTGTGTAGGATGAATTACA-TTAACGGT-----
DS0420	-----CCCAAATCTGCTGCTCTCCC-TTTACCCCTCCTTTTCTGTG-----
DS0809	-----ATGAAATCAGATGACCTTATGTTTACCTCTTCGGTTATGC-----
DS0414	-----TGATGCCACTCTTGAAT--ATGCATGTACGTTAACCCCTGC-----
00DINI16	-----CTGCGCCGAATATTTCTAGTTAGTTTTCGTTATTGACC-----
DE0614	-----TGTAATCATTTCAACGTTACTTGTG-GTACTCACACTCTCGT-----
DE0522	-----CTTAGTTTTTAACAGATAGTCCCATCCGAGTTTATTTGGTG-----
DS0826	-----TAAATTCCTTCCATATAACTTCTAGTAAGATACGCCTTTC-----
DE0325	-----AAAGTGTTTCAGAT-GAGTTAATGAGTGCTCAGCTCAGTG-----
DE0608	-----GAAGGTACAGATCGTACTAATGAGTTATATCGCAGGAACA-----

8. APÉNDICES

DE0606	-----TCTCAGAT-AAAAAATTCCCTGTGACGCTAATTTCTCG-----
DE0128	-----TGTTGGGACGTCACTATGATCCGCCCCAGGTGCCTTTTCTA----
DE0330	-----GGGGGGGTTGTTAGACATCA--AGGATCTGCCATAGGACG-----
DS0829	-----CAGTGTGGTTCAACTAATAAATGATGTACCCCATGTGTGC-----
DE0428	-----GGTGTATCGTTGGAGATAAGCGCACGTTTCGATTACTACG----
DE0714	-----ATAATGTGTCTATTAAAAAGAACCCCATACG-TTACT-CG----
DE0423	-----TGTCGTTCCCCCTTTGTTTCT--ATTAGGACGCGTCCGCTTC-----
DS0802	-----GCAGCCATTGACTTCTTCATCAGCAC-CGGCCGTTTtagTA-----
DS0822	-----CTCCATGTTTCTACCTGCACACGTACCCTTCTACCGGGC-----
DE0819	-----GAGGTGGTGCTTCCTCGA--AATGTCCTTTTtataCTCGGGT----
DE0824	-----GAGGTGGTGCTTCCTCGA--AATGTCCTTTTtataCTCGGGT----
DE0820	-----ATTTTCTCCGTAGTGTTCCTCGAGTAAGTGTCCGTTTT-----
DE0701	-----GGGCATCATTAGCTCTTCTGTTTCTTTGTTTCCCTTTTTG-----
DS0419	-----AGGGACCCAGTTGTATTTC-GTCTAAGTGTCTCCCTTCC-----
DS0425	-----TGCCTATTCAATTCATGTGTCAACTACGGTGCACGGCGGG-----
DS0728	-----CGTTAGTTTTTCATTTC-TGTATTACCA--GTGCCCGGTTGT----
DS0520	-----GGCCTGATGGTACTACGATTTCTATAGTGACCTACTTGC-----
DS0803	-----AGGAGAGACCTCATGATTTCCACTACTGAACAACATCTCG-----
00DINI09	-----TTGGTCATGCTGGAGCAGCTATGCTCGAGCAGTGCGGTTCG-----
DS0505	-----ATATGCTATACTTGACCTGCTTCGCGCCCTCAGTACACAG-----
00DINI41	-----GAACGGTCTTTCGTATCACCTAATTCGTGTTGGGGGGCCA-----
DS0524	-----GACGACTAAGGGGCTTACGACCTCATTCTGCTTCTCAATA-----
DS0205	-----ATTGCGGTTGGGGGCTTAATGTCTCATTCGGCTTGTCTT-----
DE0502	-----ATTTGACTTAACATCCTCGCTCTCCTCTTGGAACCTCG-----
DE0516	-----AGGCACTTACCATGC-CTCTCTCC-CTTGTTAATCCCAGAGTA----
DE0815	-----ATCCTATGTCATGGCCTTCAGTTCC--GTATCGCTCTCGTTA-----
DS0509	-----TCTGGCCCTTCATTTGCCGATATCGCCCAGGAGGGGGTT-----
DE0216	-----GGAACGTACCGTCGCTTGC-AACCTATCATGATCGGGTTGT-----
DS0521	-----TCTAGAGTTTAGTCAATTGCTAATCTATAAGGCTCAA-TCG-----
DE0416	-----CCATAGATGCAATTGAACCTATTGGTTGGTGACCCCATTT-----
DS0522	-----ACCTTACAGTTGCGTCAATTGGGGATTTACCGGATTTCTGT-----
DE0106	-----TGAATATAAGTGACGGTATAGACTCTGGTGTAACCTTCT-----
DE0311	-----GACGGTATATGACTCAGTTGAC-CCGTCCAACCTCCCTGTT-----
00DINI29	-----GCGGGCTGACTAGATTGAG--GACATATTCTCCTGTATCCTT-----
DE0107	-----CGATGTGCTT-AGAGCCGACCTTGGGGCGACACACTCT---CCC-----
DE0110	-----GGGGTACCT-AG---TGAATACGGGGTTACTGATTCTAGACCCT-----
DS0224	-----GGACACTG-ATACTCGTCGAGCCGTCTCTAGAACTTAGATG-----
DS0722	-----CCTACTGCATTCTTTTTTAACCGACGTTACATCCTAGGACC-----
DE0404	-----GGATGCAGAGGTTATCAGAATAGGCTTTTTTAGATTTATTG-----
DE0814	-----ACAGAGTTGTCTAAGAATCGTCTTGAATTTTTATTTTGC-----

8. APÉNDICES

DS0825	-----ATAAATATTTGTGGAAGTAATCCCATGGGGTTTTTTCGGG-----
DE0504	-----GCTAGTGGATGTGCAGGTGATTGACCAACCTTTTTCCGT-----
DE0506	-----GCTAGTGGATGTGCAGGTGATTGACCAACCTTTTTCCGT-----
DS0215	-----GGTAGCGCGGTTGAATCGCCATACCGTTGTAGGCTATTAT-----
DE0613	-----TGATTTTGAACGGAATTGTATATTACTCGTCTACCCGTA-----
DS0805	-----CCGACGGGAAGTGGTTTACTTCTCCTTACAAGACCTGCC-----
DS0516	-----GATTGGACGAGTTAATCGGAGTGGTGTACGACTTCA-ATG-----
DS0527	-----TGGAGCGGTCAATTCTACTGGGTACGCCTTTCTACACGTG-----
DS0207	-----GGTTCTATTCGACGTGTAGGGCTAACAGTTGTTGAGCCGT-----
DE0424	-----GTGATCTAGTTTAATCCAG-GTGATCTGAC-CATTATCCG-----
DS0628	-----AGATTTATTGGAG-GTCACCGAAG-CAGTATAAATTCGTGAG-----
DS0124	-----ATCGGTGGACTACGACCAATTCTTAGTACATTGGGTACG-----
DS0401	-----ATCGGCCTTCGTTGGAGTGC-ACACAAT-CCTGGTACACGTT-----
DE0630	-----TAATTATTATCAACCCGTC-TTATTAGCTCATGCAATCGGG-----
DS0804	-----AGACCGTAGCAAAAGAATG-ATTATGTACGCTACATTTTTG-----
DS0530	-----GCTTGGGTGTTACACGCCGTCG----AAGTATAATGCATTCTG-----
DS0626	-----TGGGGCTCACCCGCTCTCGGACCAAGTATAAT-CTTCCTAG-----
DE0102	-----AGGTCGTACGTCCTTAGT----ACATCATTTGTACATTACCTTG-----
DS0102	-----CGTCTTTAATGTAGATACCATGTGTTCTCTTCCGTGATAA-----
DE0727	-----TGGCTATGTCGATTATATCTCTGCTACCTTTGCTTCCCGT-----
DS0821	-----TGCATGCCGAT-ATAGCCCATCTGTTCTATTCTTAGGG-----
DE0607	-----TGCCTTTTTAATCAGTTGCCCACTACCGTTGTTCTCTG-----
DS0831	AGTGAATGTGTGCATGCCTATTTCA-CAATTGCTCCATTAC-----
DE0109	-----CTGTTGGGCAAT-TATACTCTTTCGGGTTGCAGCATAATCC-----
DE0120	-----GAGTGTTTGTGCGACTATCTATACTCGCTCCGATTTCCGG-----
DS0202	-----GGTTTCTATGTAAACTCTGTAC-ATTGCGGAGTTGCTGTT-----
DS0631	-----TGTTAATCTTTTCACTATCGGGGAGCTGGCGTGGTTGCG-----
DE0626	-----ATCGTGCGGATTCTATA----CAGGCTCATTATGCATCATTGTG-----
DS0130	-----CGGATGCGTAATT-CAGGCT-CACCCGTGTTCCATTTTGTAGG-----
DS0526	-----GAGGATCGTTACAG-GGACCGACTGCATTTATGGCTCAGTG-----
DE0831	-----AACACTCTTCATGCTTATATGCCTCATCGTGGGAAACTC-----
DS0107	-----CGCGGTCTTGATAAGTCCATACATGGGTCCCATCGAGTG-----
DE0130	-----GTCGTGTTAATCGCGGTTACACTAGACCTTTTCATCAG-----
DS0429	-----TCCAGGTTCTACGCGCGTCTGACTTGCGCCCTCCTCTCCG-----
DE0501	-----TGGTGATACACCTCGTAAATTTACTCTCGCTTCTTGCTAG-----
DS0517	-----GTGACCGATCACACCTGTATACCTTAACCTATCCATAATTG-----
DE0223	-----GCCGTTCCGA-ACTC-CATGCTTATTCCGTTCCCTGCATTGTG-----
DE0531	-----GAGCGGACGGTTCGGACATTCACACGCTTATTACATTCAT-----
DE0612	-----TTGTAATGTCCACGCATTTATCTCCTCCCTTCATGTTCCG-----
DE0703	-----AGGGCACTCTACGCGTTTAGTCTCCTTCTTCATGCTCGGG-----

8. APÉNDICES

DS0115	-----AGATGGGTCACCTCTCGCTACATTTCTGCTTGCTTTCTCTCT-----
DE0209	-----TAGCCGTAAG-TCATGTGCTCTCTG-TATGTAT-TACGCGG-----
DS0506	-----GCAGGTTTAAG-TCTGCATGGCCCTCT--TATATTTCTGTGCG-----
DE0510	-----CAGG-GTTTCAGGGTCCAGAGATCTGATTTTATACTGAGTT-----
DS0118	-----TGTAGGCACATCATGGTCTCTGTAG---AATTTTATGCTCTGTGTT-----
DE0310	-----TGTATGTCTATA-CAGTTCCGAAACATT-CAAACCATCCAGT-----
DS0523	-----CGTGTGCTAGCAGGACTTAAACGTCATAGATCACTTTGTA-----
DE0625	-----TGA--CAGTTTATTTTCTAA--GCGTACTCCACTTCATGTTACA-----
DS0607	-----TAATTCAGCCGATACTCTAACAGCCTATTCATTACATTC-----
DE0721	-----CGCGGGGGACTCGCTCTGTTTTTATGCCCTAATCAGTTCC-----
DS0823	-----AGGCCGGAGAGTCACT---TGTATATAACTTACTATGTCCATC-----
DS0302	-----GACTGTTCGAGGGTACTGTGCCCAATGTTTGCCTGCGCT-----
DS0303	-----CGGACTCGATATCAAGTGTTATGTCTCAATCATGTTTGGT-----
DE0116	-----AGTTAGGCGAGGGCTGCTTCACATGTCTGTCTTTTATACT-----
DS0709	-----AAAGTCGAGTCTTGTTTGTCTGACGGCTTATATGACTGC-----
DS0228	-----GTAGCTTTTCT-GCATCCCGACTGGCTTAGAAAAAGGATG-----
DS0319	-----TTGTAGCTTTGACTCGCAGCTCGTATCTCTTGCCCGGTTT-----
DS0624	-----TGAACGCAACATCGACGGTATTTATGTGTTCTTCGACTG-----
DS0704	-----GGGTGTTTCAGCGGAACGGTGTCCGTCTTAACCTATCTTC-----
DS0504	-----GAGCTGCGTCGGTCGTTACCGGTCCTTCATACTGCGTTAC-----
DS0608	-----TGACGGCATCCGACGGCTTAACTGTTCTTCTTATATCCTG-----
DS0816	-----GGACACCTTTT--TTACGTGATCACGACGGGTCTATTCTGTT-----
DE0309	-----ATGATGTAACCTTCTCACTTACCCGGT-TATAACTTCAGT-----
DS0806	-----GACTACTACTATATTTACGGGT-TCTATTCTTCACAGTTCC-----
DE0610	-----ACAAATCTCGTAACGTGT-TCTATTCTGTTCCCCCTTA-----
DS0807	-----TACAAAGAACTAAGCCCGTATCTATCGGTTTTCTATCCCG-----
DE0514	-----TTGTAAA-GTCGGTGCCATA-CGATTCCTCATCCGCACGTGG-----
RE0112	-----UCUGCGAACGCCUGUACCAUU-CGUUUUAUC--CCGCACUUGC-----
DS0531	-----AAGCG-GTTGAAACGTGT-TCTCTACTACTCGATTTATAAG-----
DS0725	-----TGTAGA-GTTGAAGTCACG-GGATTCTAACGCGATTCTAAGG-----
00DINI11	-----TTACTGTACCTAAGACGGTGCGCCTCTTCGTATGGATCCC-----
DS0321	-----GAAATGTGATGCCTATTGGACCT--GGCGGTG-GCATCTTTAG-----
DE0411	-----TGTACGATAT-TGGCCGCTTTGCCATCTTTTCGTTACCTGG-----
DS0422	-----GGACATGTGGCCGCGGTACGAACTTTTTTACCTTTTTTGTA-----
DE0214	-----CCAGAACTTAGTTGATCACTTTCGCGACTCATA--CCGTTGG-----
DE0828	-----GACTTTGTCTCTCCTGGTACGTG-CTCATGACTCGTTGGGG-----
DE0114	-----AGGAAGTTTCTTGCCACTTGGAACGGGCGCAGGTTTGTA-----
DE0621	-----CGTTGCCCTGTCTTGCCGTGACTTGGAAGTATTTATG-----
DE0731	-----GTTATGCTTTGCTCTCGCTGCGACCTG--CTCAAGTTTATAG-----
DE0324	-----GGGTTCTCTTCTTGTATACTGTATACGCCTAGTTGGAACG-----

8. APÉNDICES

DE0808	-----ATACTGGTACATTCCATGCGGTTGTTTGGACCTATAGACA-----
DS0502	-----GATTACTCTTATCTGCCATACAGCTG-TGGGGTCAAGCTCC-----
DS0726	-----TCATGCCCCGTTA---AGGAG-TGGGGCCACACTATACTCCCTGC-----
DE0427	-----TTTATGC-ACACGGGACTTATACTGCTCGTTACGCCATTTA-----
DE0827	-----TTATGCTACCCGGGTTACTTTTTTCGTCACTGTACTCCTTC-----
DS0424	-----GAAGACTTCTACTATCCG-----TTAACTTCCCGTTACGAAGCTCG-----
DE0513	-----AGACAG-GTGCTCATTTCCCGCCGGTACTCGGCCATCTCT-----
DE0520	-----AGACAG-GTGCTCATTTCCCGCCGGTACTCGGCCATCTCT-----
DS0117	-----ACCAGCGTGCTCGTACGGAGCC--CACTGGGGTTTCTCTATG-----
DS0208	-----TGGCTTACCCCTTCTGA-ACT-CAACTGGCCAGTTCTATCAT-----
DS0223	-----TGGCTTACCCCTTCTGA-ACT-CAACTGGCCAGTTCTATCAT-----
DE0518	-----ATAGGTGACACTACTTATTACC-TACCTGTTCCGTTCTATA-----
00DINI39	-----TGCTTTTGTGTT-GAT-CAAGCTGGCCTGCA-TGTGGATTGTTAA-----
DS0525	-----ATGCATTAGCA-GATGCAATGTGGCAGGCA-TGTAT-TCGCCG-----
DS0101	-----CCCATACATAGC---GTTACGCTGAGGCTAGCACTGCTTCCGG-----
DS0127	-----CCCATACATAGC---GTTACGCTGAGGCTAGCACTGCTTCCGG-----
DS0330	-----CCCCAGGTAGC---TGAGGTTGAGTGCAGCACC CGAAGT GAG-----
DE0616	-----TCAAAAGTCCCAGTGTGCGCGGTTGCTTTCAGTGTTTAT-----
DS0613	-----TGGCAAATGCTCTGTGTCATGGAGT--GGCTTCCTATACTT-----
DS0619	-----GGCAGG-GTTGACTGCTGCTGTGTTGGACATCCTAACCTTC-----
DE0111	-----GCTCAGGGACTGTGAAG-GAGCCTCCTGTCCAGTATAGCGG--
DE0718	-----AGCTCTGTGGAGTGCTGCTATTAAATATTCTACGTTGGT-----
DS0203	-----CTCATGTTGTGTGGTGCCCCAAAAGTCCTAGTTGGACG-----
DE0728	-----AAATTAAAGCGTCTCTCGCGGAGGACCGCTTCTATCTCG-----
DS0514	-----TTTACTTCAATTTCGTCTCTTGATGAGGTCAGCAGACGTGT-----
00DINI31	-----GTGAACCAGCTGAAATGGGGTGCCGGCGCAGGATGTGCTT-----
DS0212	-----AGTCCCCTAATATAGGGTTTCGGGAGGTGGGGGAGTTTTC-----
DE0218	-----CACGTTGCGGCGCAGTATATCCTTCGGCGTTAGACACTCA-----
DE0220	-----TTGGTTAGGGGGCAGGCTATTATGC--TGTTAGATCAAAGG-----
DE0407	-----GCCGAGCTTATTATACCGTTTCGTCAACGTTGAACAGATTA-----
DS0309	-----TGTGTGGACCTCAGTTTATAGTAGGTTTCAGGATTTACACG-----
DE0418	-----AATGTGGTCAGCGTACAGACGAGCGGAAGTAACTTCGTG-----
DE0121	-----TGCCATCCTGCTGGCGTT-GTCCCTGCCCACGCTGCTGTGT-----
DS0110	-----TCCATTTGCGCAAGGGAAGTTCCCTCGCTCGTTGCTGCC-----
DE0228	-----GCTCTCACGGTGGGTGCAGGTAGGCGCTCCGATCGCTGGG-----
DE0315	-----AATTAGGGTGCGGTTAGTCTCGCCCCCTCGTTTGGTTCACGT-----
DE0202	-----ATGCTTCAGGAGTTCTGGCAGGCGC-TTTACTCCGGGGTAC-----
DE0229	-----GAGGGTCAGTA-TTTTCCCGGCGCGTTTCTCCCGCGC-----
DS0301	-----ACTGTAACGTGGAGAACAGGTACCGTAGTTCACGCCGGCC-----
00DINI22	-----CTTAATAATCGTGG-CATGAGAGGAACGAGTGCAGCAATCG-----

8. APÉNDICES

DS0226	-----ATAAGTAGCCGGGGACATCTCGGGTTACGGGGGACTTGTG-----
DE0201	-----GATG-GTGAGGACCCCTATTGGTGGCCTTCGAGGATATCTA-----
DS0601	-----TAGAGATGAGGGAAGAGCTCCAGTGTCTGCCGTGGTATGG-----
DS0413	-----GTGCGGGATGACTCCCGTGTGTGAGTGACAGATCCTTT-----
DS0218	-----CCGATGTGGCAGTGCCCGTACCCGGGTGCG-CATTTCGTAT-----
DE0129	-----AGGCACACTAGTGCAGTAACCTTGATGGAGCCAGATCCCTT-----
DS0114	-----ACCCTGGTTTGTACACAGGTACAGCA-CTCGTGGGAGACT-----
DE0328	-----TGTATATTTGAAACAGTCGTGGCTAAATTA-ATCGCTCTT-----
DE0503	-----TATGTGCGAGTTGTAGCAGCCGGCTTGATTACGGTACTAT-----
DE0217	-----CAAGGGGAATGTAACCCTCGTCTCC--AATGCCGCCG-TCGAG-----
DE0627	-----AAGTTTCCACAAACCTCGTCTTGTTAAGTGCAGCCG-TATA-----
DS0511	-----TATATCTCAGACTATATACCCGACTTCGCCCTACTGGTG-----
RS0411	-----AUUCUCACUGUCGACUACAUUACUGCCGUG--UCCACAGGUG-----
DS0408	-----TACTCCCTCCGCCACCAAAAGGTAGCCGCACTGTCTAAG-----
DS0428	-----TACACATGTAACCGTTTCGATCTAAACCCTGAGTCCTTGG-----
DS0716	-----ATCTCGGACAATAAAATGCAGCATCGATGTCCACGTACGG-----
DS0724	-----CCTTCCTTTCTCAGACGAGGGAAT-ACATCCGCCCACTGT-----
DE0221	-----GAGTCGACCACTGGTACTCATAATGCAGACGTCCAGGTAT-----
DS0119	-----AGGGTACTGGTCTAGTTTCCCGGAAGTCTGCGTACCCAG-----
DS0304	-----GCAGTTCATATCCCCTC---GACTCATGGTTGTAAATTCAGG-----
DS0313	-----GTCAGATGGCCTCAGAAGACGTATGGTC-TAGATTGCGGGT-----
DS0703	-----CGTTGCCACAAGCACTCAGCCAATACGTGCCC-TGAACCTCT-----
DE0210	-----ACCCGGGCCGGGGAACTCCACGGTGCATTTAATGGCGC-----
DE0329	-----GTTCTCTACCGGAGCCGGGGCT-CGCACACGGTACGTCTAC-----
RE0728	-----CGCAUUCCAG--ACCAAGGCCUCGCCAGACACACACUGCC-----
DS0308	-----CCTAGCAACAAGGTTCCCGCCCCGGGAGACGTGAGACTGG-----
DE0115	-----GCTTTCGCAATGAGCAGCCTGCGTCGGACAAACAGGG-----
RE0503	-----AACGUUCCGUGUGAGAGUCUCAUGGCGUACAAACUGGG-----
RE0205	-----GAGUUUUGCCGUGAGAAUAAGAGAGAUACACUCUAUCU-----
RE0623	-----AGCAGGUGUGCCUCGACACAACCAAAAAGUUAACGGUG-----
RS0622	-----UUAAUCUAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCC-----
RS0635	-----UUAAUCUAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCC-----
RS0639	-----UUAAUCUAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCC-----
RE0101	-----UUGGCUCUGCUUGGCC--AACCCUGUCCGAUUUCCCGUUCG-----
RE0814	-----CGCGGCUCCUUGGUGCCG--AACGUCAUACUAUCUCUCUGUG-----
RS0227	-----AAAGUGCUCAGCGGUUUCUCAAGCUUGGAGCCACAGUCC-----
RE0109	-----CCGGGCCCCUUCUACCGCCU--CAAGUGUAGUGCGGCACCUU-----
RE0829	-----GUCGGCCACUGCUUCUGCCAG-CAAGUGAUGUGCGUUGUUG-----
RE0327	-----AUAGAACAUGUCUGCCAGGCA-CAUGCGUAUUUGGUUUCG-----
RE0801	-----UCAUAAAUUCUAGGCCGUACGUCUUGUGGAUUUCACGCCG-----

8. APÉNDICES

RE0108	-----CACGUCAGCGUUAACGCCUGAAUUCGACU-UUCUUCUACCG-----
RE0529	-----CGGGUCAUCGAAACAGA-UGAAUACGGUU-UGCUACUUGUGG-----
RS0110	-----UGUGUCAGAUUGGAAU--UCGUCCUGCCAC-CGCGCCUGUCUGU-----
RS0222	-----UGUUAGAUGCAUCGGUCCUCCUUGCGC-CAUAUCUGU-UGU-----
RE0333	-----CGCGCGGGCUCUCUUGGCCUAGAUCGGAUGUACAGCUUGG-----
RE0619	-----GACAAAGGGGUCUCGAAGCGAGAUAGGUGGUA-AGCUUCG-----
RE0325	-----UGCUACCGAGCACCUCUUUUGGACCCGGCGCGUAC-GUUCG-----
RE0811	-----GCCCCUGGGCAGCGGGAUUCGAUCCUUCGGACACUGCGCG-----
RE0518	-----GCGGAUUCUGGUCGUCGUCAA-AGCACGUUUG-UCUUCGCG-----
RS0616	-----UAUCUUACCGUUUCCUUGGAGCUGGUCCA-GGAACCUGUG-----
RS0713	-----GCCAUUAUAGGAGGUCGUGAUCACAACCGUUU-ACAUUGCG-----
RE0102	-----AUUGUAUGUUAUUUAGUUAC-UGCGUCUACCCGACGGUGUG-----
RS0116	-----GUAGGUCGUAAUCUAGA-UAAGUCUACUAGACUGUGUUUA-----
RE0523	-----AUUGUAAGCUUGA-AGAAUUGUUUAGACGGCGUCCUCUGG-----
RS0829	-----UCCAUGGU-GU-AAAAUUGAUUUUGAUGGUUCCUCUGGUCG-----
RE0221	-----GUGAUGCUUCUAC--CGGCUUGUGCCGCCGUUGACAUAUUG-----
RE0514	-----AGGUGUGAUCCUCUAGCUGCGCUUUGUGCCAUCGCGGCC-----
RS0302	-----UGACGAGAUGUGUGAUCUACUUGC---UGUUUGUAAUACUUUG-----
RS0721	-----AGAUCUUUGACAGUUGCGA-GGAGUUAGUGUGUCUACCUCG-----
RS0602	-----AAACCUUGUUUCUGGC-GCCCGCCGGAUCUUUUUUGAGUGG-----
RS0604	-----AAACCUUGUUUCUGGC-GCCCGCCGGAUCUUUUUUGAGUGG-----
RE0107	-----CCCAUCAUUGUUUCUCUC-CCACACUGU-UUUUGGAUGGGUG-----
RE0527	-----CAUAUCUGUGUAAAGCUGCAUGCCUAUGCUUGGUUGUUG-----
RE0729	-----GACAGGUUUGUGUCUAUC-GGAUGAUUAUUGUGCGUGCG-----
RS0804	-----GCGCACACCUUGAUAGUGUUUAGAGGAGUGAUCACGGUGG-----
RS0810	-----GCGCACACCUUGAUAGUGUUUAGAGGAGUGAUCACGGUGG-----
RS0705	-----GC-UACCGUGGGCGCUUUUGCGGGAUUGAUGAGUUUAAUGG-----
RE0405	-----UGUGAUA-GUUGGUUGC--GCGCUGUUCUAUGGAUAUCUGGUG-----
RS0401	-----CCUAAUAUAGUGUUUGCAAGCGCCUUUGCAUGGAUAUGGG-----
RS0419	-----UCACGUAAUGUUAU-GGUCGA--UUGGGCAUUCUUCUUUCUUGC-----
RS0525	-----UAAUAUGUAGGUUGACCUCGUGCAUACGAUGAUCUUGUG-----
RE0103	-----GUGGCUGAAUAUCGAUAUU-AUUAUUCUCUUUUCGUG-UGCC-----
RS0638	-----UGACGCUGUAUAGUGGCUCUGAGUAUGAACUUCUCUCG-UG-----
RE0411	-----AGAUACGCAAUCGGG-AGAUCUUUGAUUCUGUUCUCCG-UGG-----
RE0516	-----GCAACCGCUAUCGCGCGGAUCUGUGCUGUUAUUCGUGG-CG-----
RE0809	-----ACUCCGUCGUCUGAAUUAUGGUGCUUUAUGAAG-UGUUGG-----
RE0818	-----ACUCCGUCGUCUGAAUUAUGGUGCUUUAUGAAG-UGUUGG-----
RS0123	-----CGCGUGGCGCGGAUAUAGACCGUCUUGUAACGAUGUUAG-----
RS0105	-----AUCUGUCCCGUCAGCUCUCUGUGCGCGUACGGUUGGGUAU-----
RS0120	-----CUCCAGCUCGUUCUCUUCUCUUGUCCGACGCCGUUUCGGU-----

8. APÉNDICES

RE0312	-----CGAUGAGUUCGAUCUCCCCGUUCUGAUCGACGUGAGCGUG-----
RE0525	-----AGUGGUGUUCGGACGGUGU-UGUCCGUCUGGUUCUGUCCG-----
RS0218	-----GUCCAUGUCGGGCUGUCGUGUAGCUGUUUUCUCUUGUCC-----
RS0115	-----CUCGCCGUCAGUAAGGUUCA---UCUCGACCGUUUGCUUUUG-----
RS0125	-----AUCGGUCAGUCCUGUCCCCCUCUCUCCCAUUCUUCUUG-----
RE0329	-----GGUGUUAUGAC-ACUCUUGCGCUUUCUGUAU-CGUUGUCCC-----
RS0605	-----UGGUGUGGGGUC-UCAGUCACUCAUUAUGUGUACGAUGUG-----
RE0505	-----GGCAAUCUGACGCGUGGUUGUCUGGACUAUU--ACUUGGUG-----
RS0826	-----UGUGUUCGACGGUGAUAAUUGGAAUUUUUGACUUCUUG-----
RE0808	-----GUUGUG-CGCAUGUGGUAACGGU--UAUUUCCUGUCCGUGCG-----
RS0429	-----GCGGUGUCUUAUCUGGUGACGAUAUCAUUCUCCGCUCU-UG-----
RE0515	-----GCGACACCCUCUGUGACCAUGGC--GAUUACCGGAUCC-UGGG-----
RE0106	-----UGCAUUCUUUAAUGGUAAGAUGUUUCAUGUUUACGCGGUAG-----
RS0417	-----UUGUCCUAUAUGACGAAACGCUCCAUCCUACGUGGUACG-----
RE0810	-----GAAGACGUGACGCCCUGCACUUGUUUAACUUGGCUGAGUG-----
RE0813	-----GAAGACGUGACGCCCUGCACUUGUUUAACUUGGCUGAGUG-----
RS0403	-----UGAUUUUAUGACGCCCUCUUAUGGUUGUUUCAAUUGGCU-----
RS0603	-----UUUGUGGGCUUUUUGAUGUGCCCCUCUAGCUGUUGUUCG-----
RS0610	-----UUUGUGGGCUUUUUGAUGUGCCCCUCUAGCUGUUGUUCG-----
RS0812	-----GCAUAAUUGGUUUAUCAUGUGUGCGUCGUAG-CUAGGUGGG-----
RS0820	-----GCAUAAUUGGUUUAUCAUGUGUGCGUCGUAG-CUAGGUGGG-----
RE0724	-----UGAGUUAGAGUUUCCGGGUUCUUGGUAGACUAUCUGGGG-----
RE0209	-----GUCUUUGUCUCGUCGUUC-CACUCUCAGGCUUUGUUUCGUC-----
RE0211	-----GUCUUUGUCUCGUCGUUC-CACUCUCAGGCUUUGUUUCGUC-----
RE0520	-----CCCACAUGAACUCGUCCUUCGUAGUCUC--GCUUGGUGUUG-----
RE0620	-----ACAGUUGGCCACGGUCUAGAU---UAUGCGUUUGUCUUCUCG-----
RS0523	-----UGCGACG-UUCUAGAUCUCGUCUGCGUUGUUUCCUAGGUG-----
RE0311	-----UAAAUCGUUUUC-UGGACUCUCCUCCUCUUU--GUUCGGGUC-----
RS0216	-----UUGGGUGUAUAU-UGAGGACUGAGGUUUUUU--GUUCGUC-----
RS0229	-----UCUUGCACCCGC---UGGUUUCUGUGUCUUAUUAUUGGCG-----
RS0404	-----UCUGCACCCACGUCCUGAUGUAUCCUGAGUUUAU--GUUGGG-----
RE0216	-----UCUUGCGUUCACGUUUU-UACCAUGGUUCGGUUGUUUUUG-----
RS0819	-----UGUUCUCGUUUUCAUCUGGUUUCGAUGAUUAUUUGUGGG-----
RE0611	-----GCAGCGACACUUAACUGCUUUAA-CGAUGCUUUUGUGGGUG-----
RS0311	-----UGCAGCCUUAUCUCGCUUUAUUCGGUUCUUUUGCGUGUG-----
RE0418	-----UCCCCUGGAUGGAACUCUCGAUUUAUACUUCUACGCGGGG-----
RE0702	-----UACCUGGUUAGCUAUGACUAAUUGGCCUCUUAAGGCGUGG-----
RS0405	-----UGCAUUUUAUCGUUCACUCUUGGUUCUUUACGUCUUGGUG-----
RS0406	-----UGCAUUUUAUCGUUCACUCUUGGUUCUUUACGUCUUGGUG-----
RS0206	-----AGAGCUAUCCUCUGCGGCAUGGUUCUAUAU---GGAUUUGUG-----

8. APÉNDICES

RS0522	-----UCAGCCCUUAGGGUGGUUGUGUAUUCUGGGUUUGGUGG-----
RS0221	-----CGUCAGCGUCAAUUUUCUCACUCUUAUUGUUUGCUC--GGUG-----
RS0619	-----UCGUGAGGUUUCUGGAUGACAUUGUGU-CUG--GGUGUAGUG-----
RS0322	-----UACUCUUUGAA-----UAAUUUAUGGAUGU--UGUGCUAUUGAUGG---
RS0324	-----UACUCUUUGAA-----UAAUUUAUGGAUGU--UGUGCUAUUGAUGG---
RS0328	-----UACUCUUUGAA-----UAAUUUAUGGAUGU--UGUGCUAUUGAUGG---
RS0106	-----UCUCUCCAGAA-----UAAUC-AAGGUUAU--UAUUCUAUGCAGU-----
RS0317	-----UCUUUCUAG-----CAUUCAUAUUUUGGGCACGUGUUGCUAGG-----
RS0333	-----UCUUUCUAG-----CAUUCAUAUUUUGGGCACGUGUUGCUAGG-----
RS0828	-----GCAAGUUCUUUUAAA-----CAAUCGUAUAUGG--UGCACCACCG-----
RS0830	-----GCAAGUUCUUUUAAA-----CAAUCGUAUAUGG--UGCACCACCG-----
RS0507	-----UGUUAUUAAGUCGCGUUAUUUUUUGUUU-CU-AGUGUUGGUG-----
RS0515	-----UGUUAUUAAGUCGCGUUAUUUUUUGUUU-CU-AGUGUUGGUG-----
RS0714	-----UUAUUGUUAAG----GUGAUUGUCCGUUAGCC-UGUUUUGGUCG-----
RS0715	-----UUAUUGUUAAG----GUGAUUGUCCGUUAGCC-UGUUUUGGUCG-----
RS0718	-----UUAUUGUUAAG----GUGAUUGUCCGUUAGCC-UGUUUUGGUCG-----
RS0806	-----CGGCGUCCAAUGUGAACAAAGUUUUUCUGUAGC---GUAUUG-----
RE0207	-----UGAUGUGUGACUGGCACGC--GGUCGUUAUGUUCGACUG-----
RS0408	-----UCACGUUUGU-AUUGUGUGUC-AAUAGCUGACG--CGUUUGU-----
RS0326	-----UGU-CUUUGUGUGUCCGUGG-GUUAUCGAGCGGUGUAUG-----
RS0334	-----UGU-CUUUGUGUGUCCGUGG-GUUAUCGAGCGGUGUAUG-----
RS0615	-----AUGCGCUGUAUCUGUUUAUGU-GC-ACUCUAGCG-UGUUUGG-----
RE0212	-----GUUAUGCU-UGAGUCUCAUCCUUGGCUCUUGAGC--UUUUGG-----
RE0827	-----GCGCUAUUAGUGUCAGCGU--GUUCCAGAGCGGUUUGUGG-----
RS0703	-----UCCGCCUUGUCUUCUGGGGUC--AUUGAAGAGUCGUGUUG-----
RS0712	-----UCCGCCUUGUCUUCUGGGGUC--AUUGAAGAGUCGUGUUG-----
RS0704	-----UCCGCCUUGGCUCUGGGGUC--AUUGAAGACCGAAUUUG-----
RE0213	-----ACCAUCACGUACC---UCUAUCUUUUUCUUUGCUGCGCAUACG-----
RS0613	-----GUUUGUACCGUCACCUAUC---CUUAU--UUUCCGUUACUGUUG-----
RE0815	-----GGCAUAGUCCAGGUGCUG--UUUGU-UUCGUUUUCCUGUGG-----
RS0427	-----GUAAGGUGAUGAUUCUGU-AUAAUACUUACUGUUGCGCCC-----
RE0710	-----UGGAGUACCUCAGGAUU---CUAA-AUGUUUCCUCCUGUUGG-----
RE0610	-----AUCCUGGUUUCUGCUUCUCCGUAAUGCCUACAUGCGUCG-----
RS0306	-----GGAAUGCUGCUUUUCUCUUUACGU--CGCUACGAUUGCGUG-----
RS0814	-----GUUCCUGUGUUUAGCGUUGGCUGU-GUUUCC-UUCCGUGG-----
RS0817	-----GUUCCUGUGUUUAGCGUUGGCUGU-GUUUCC-UUCCGUGG-----
RS0207	-----GUUUUCUGUUAUGCGCGGUAGAUGUUGUUAAC-UUUUACC-----
RE0326	-----GGCUCUAAACAUGUGAAUUAACCUAAGCCUG-U-UCGUUGCG-----
RE0524	-----GGGUUAAACAACUCCUCGCCUAUUUGCG-UGUUGCUGCG-----
RS0510	-----UGUAAUUGUGUUCGUCUAGGUUUG-UGUAGUGUGGCCG-----

8. APÉNDICES

RS0708	-----AUCGGAAAUGUGGCUCGCUUCGGUUUGCUCUUUGUGUUG-----
RE0531	-----UCAGCUCAAUCGAUUUGGACUUGCUUGGGUAUUCGUAACG-----
RE0307	-----ACGCGGAUUUCGCUUCGCGGAUGUUUAAUUUCUGUUCGGGG-----
RS0609	-----GCUUCCCGGAGUUGGGCUCGUACA-GUUUGGUUUUCUUG-----
RE0334	-----UGCGUUGCCUAGCGCUGGCUCGUGGACGUUGGCUCGCUGG-----
RS0430	-----AAUUUAGCUCUAGGUUGUUUAUUGUGUGCUAACUGGCGGG-----
RE0607	-----CGUAGUGGUUGAAUUUGUAGAGCUCUUUCUGGUUUUGUUG-----
RE0721	-----GACCGCCGGGUAAUUUCUGUUGGCUUUCGUGGGUGG-----
RE0310	-----GAUUUUCGUAAGUGAGCGAUUUCGCGUGGGGUUACCUUGU-----
RE0322	-----GAUUUUCGUAAGUGAGCGAUUUCGCGUGGGGUUACCUUGU-----
RE0320	-----GGCUCU---UUUCUGUUUCGAUGAUGCGCGACAUCUCCGUCGG-----
RE0701	-----GGCUCUAAGCUUUCGUUUCGUUCGUACGCUUCCUCGUGG-----
RE0330	-----CAACCUGGCGCUUUCGAGUUGCGUUUUGGGAUGCUC-GUGG-----
RE0403	-----CUCCCCUCUGUACAGUUUCUAUUGGGAUUUGCUCGCCUGG-----
RS0205	-----UCCAGCUAUGCUUUUCCCCGGGGAUUGAGGUCUGUUGU-----
RS0618	-----AUCUUUGACGCUGGAUUCGCGCGGCCUGAUUUGUUGGUG-----
RS0412	-----GGUCCGUUUAAGUUAGAUGAUCG-CUGGCUAUUCCUCUUGU-----
RS0617	-----GUUUAGGAGUGAUGGAUGUCUGGUUCCUCGUGCUCUAUUG-----
RE0826	-----AGUCCUGGCACUCUAAGCUUGCAACUGUGAACUCGUUGGG-----
RS0118	-----CUUGCCGGAUUCUUGGACGCUAGGCGCACAUGUGUUGUC-----
RS0219	-----UGCCGGC-UGUCCUUGCGUGGGAUUCUGUUGCGUGCUUA-----
RS0723	-----UGCCGGUGUUUCCUGCAGCGUAGGUUGCUAUUCUCUGG-----
RE0706	-----UGUCCUAGUCCUCUACUAGAAUAAUGUUG-UUCCCUACGCG-----
RS0824	-----GUUAGUGAAGAAAAAAUUGGCGUUGAUUCCUCUGCUGCC-----
RS0815	-----UUAGUUGUUUUUUCGUGUGGCUAGGCCACAUCUCUCCG-----
RS0825	-----UGAAAUAAUUUGGUUGUGUUCUGAUGCUCUCCUCCUGCGCG-----
RE0709	-----CGUUUUAGGUAAGUUCUCUAGGGUACCCUACCCCGGUG-----
RS0217	-----UGUGGCUUCUAGAGAAUUUUUCGUUGGGACCGCUCUG-----
RS0623	-----GUGAUUCAAAUGAAAAAAUUCAGUUAGGGUCUCUCGCGCG-----
RS0634	-----GUGAUUCAAAUGAAAAAAUUCAGUUAGGGUCUCUCGCGCG-----
RE0116	-----CGAAAGACUGCUACUGCCGUUCCGAUCUCA---AGUUCUGUUG-----
RE0707	-----AUAUGACAGCU-CUUCGCUUCAGUCCUGA---CGUCCUGCUGG-----
RE0708	-----GCGUCGAUUUCUCGGAAGCCGUUAGAGUCUGUCGCGGGG-----
RE0816	-----CGAAGGUCUCUCGG--GCUAUUCCGA-UUUGUUGUGUCGCGUG-----
RE0621	-----CAUCUAGUACCUAUCGGCGCUGUUUCUUAUAAC--CCGGCG-----
RS0112	-----CUUAUACC-AUCGUUUCUAUUUCUGUGUAA--CGGGUGUCCUG-----
RE0831	-----GUAUCAACUUAUCCGCAGUCUCCUAUU--CCCGUCUUCUGGG-----
RS0722	-----AGUAGCAAUCGUUGCGCAGUUGUCUCAG--AUUCGGUUCUGG-----
RS0509	-----GUUAUGCGAGUAUGAUAGACGUUGUGAUGGCUCUUGU-----
RS0809	-----AUGAGGUCCGUGUUUGUUAAA--GUUGU-AUGGAUUUCUCUGG-----

8. APÉNDICES

RE0230	-----CAGUUGAAAAGACAUUUC-UUGUCCCUUUUUCGUCUGAGCC-----
RE0427	-----CGGGGCGUGGGUACUUUUUCGG--GCUUCUAA-UGUCUGGGG-----
RS0107	-----CGGGGGCGCGGGGACUUGUCGUGGUUGCUUUUUA-UGCUCG-----
RE0633	-----CACUGGUAACCGUUGUCGUGGUAGCUCCUAGUGCGCGCG-----
RS0808	-----UUACCGUGAAAGUCGCUUAGUUAUUAUAGUU-CCGCGUUGG-----
RS0816	-----UUACCGUGAAAGUCGCUUAGUUAUUAUAGUU-CCGCGUUGG-----
RS0822	-----UUACCGUGAAAGUCGCUUAGUUAUUAUAGUU-CCGCGUUGG-----
RE0412	-----UUGCUCAGUCAG-CGUGGAAAUAUCUUGUUACUGAGUCGG-----
RS0421	-----CGAACAAAGC-CUAUGUCAUGCUUCCCCCUCUGUUGCCGGG-----
RS0726	-----GUGCGAAAACC-UGUUGUUAUGCUGAUUCCGUCUUUGUGG-----
RE0712	-----GCGGUUGCAAGGCGCGUUCUGAUUAUUGACUUGUUUGCG-----
RS0214	-----AAUUGGGCCCUGGGCAAGGCGUGCUUUUAUUGCUUGCUUU-----
RE0308	-----AGCUAGUUCAAUUGUC-CAGGAGACAUGCUGUUCAUUGGG-----
RE0430	-----GGUGCCUCUUCACGC--GUGCCGGGUUAUUGCUGGUUGUGGG-----
RS0316	-----UACGCGGCUCCACACUCCAGUUCCGUAUUUCUUCUGUCUG-----
RE0416	-----UGGCAUGUUCG-UAGGUUGGGAGUGCCUUGCUCUUCUUCG-----
RS0418	-----GCAUGUAAGAUAGGUUCCAAUGUUGCUGUCCGUCUCCCG-----
RE0419	-----GAACUAAAACG--CGUUUGUAAUUGCUGCUUCUCUUGGGUG-----
RE0613	-----AAUUAACACGAUCGGGUGUGUCUGCUUCCCCCGCGGCG-----
RS0126	-----GUUGCGGAUCAUCCUGCCGUUAUUUCCGCUUUGAGACCUG-----
RS0719	-----UGACUAAAAAGAUAGCGUAACACCUGUCCCUUCUUGAGUGG-----
RE0803	-----CGCUGCCUGAGAAAUGGCCUUCCUUGUUUAAACCGUGGG-----
RE0812	-----GGUUGUAUAGCUAAGGGGAUGUCCUCGUAUGUAACGGGCG-----
RS0201	-----AAGUGUCUGCCGGGUAGCGUUAAC--GUCAUAUGUCCUACG-----
RS0720	-----UCCUGUGUAUUGGUUAGGGUCUCCUCGUCUUCAGUCUU-CG-----
RS0637	-----GUUGCUGGUAUAGGAUCCGUCUUUUUAAUAUUCUGGGG-----
RS0641	-----GUUGCUGGUAUAGGCUUCCGUCCUUCUAAUAUUCUCGGG-----
RE0118	-----GCACGGGGGUUGUGCCUUUAUUA--UGUAUGUGGUUCGGG-----
RE0214	-----GCUAUGGGGUU---CAUUGUUUA--UGCUGUUGAUCACGUGU-----
RE0502	-----GAUUUCAGUGACUUGUGUGGUCUGGUUACGCGCU--UCGUG-----
RS0607	-----AAAACGGU--CUUCUGUAGUUAGU-ACGUGCUGCUCCUGCCC-----
RE0631	-----CGUGUUUCGGUAUGUGG-GUUGGUGGUUAUCUUUCGGGUG-----
RE0726	-----UCGGGUAUGUCUAUGUGUUGUGGGAGAUUAGGUUUGUUGG-----
RS0503	-----UCUUUAACAUGGCAUUAUUUCGUUGGAG-UUAUCUUUGUGG-----
RS0526	-----UCUUUAACAUGGCAUUAUUUCGUUGGAG-UUAUCUUUGUGG-----
RE0127	-----UUAAGACAACCUUCCCGCG--UAUCAGUUUGUUAUUGGC-----
RS0314	-----CGCUCACUACUUGACCGUGA-UCUUUUUGUGCUGUGUUGGG-----
RE0210	-----AUACUACCAGACCCGGC-UAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCC-----
RE0218	-----AUACUACCAGACCCGGC-UAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCC-----
RE0223	-----AUACUACCAGACCCGGC-UAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCC-----

8. APÉNDICES

RS0827	-----CGUCCCUGCGUAGCUUAAACGUUUUAUUGUUUCAUACGGUUG-----
RE0227	-----AACUGGCUAGCUUGCGGCGUUUCUUAGGAUUGCAUUUCU-----
RE0627	-----CCCUCUAUACGUUUCGGGGAUUUUCGUGGUUUCAUUGCGG-----
RE0730	-----UGUCCGUAGGGUCUGUUGUAGGUUAAACUUUGCUUUGGCG-----
RS0415	-----UCGUUGGGUGUAGUAUCAUCCG--UUUGAUUACGCGGAUGU-----
RS0213	-----GCGUCCGGUGUAUU-UUGAUGGAUGUUCGAUCGUGCUCCGU-----
RS0315	-----GCGCGCCUGUCCGGGGUGUUUUUAUUCAU-UGCGAUGUUG-----
RE0226	-----UUCGCAGAUAAAGAUUUUCAUUAACAUAUAGCAAAGUGCUGC-----
RE0605	-----AUUCUGUUGUCGUAAUUAUUGUGGAGCUUCCCCGUUUUG---
RE0414	-----UACUAGGUGAAUUAGGUUUAAGUUAGAAAUGCGACGUGG-----
RE0819	-----CCGCCGAGAUGUCGUAGGUUUAAGGUGUACAUC-ACGGGG-----
RS0801	-----UCUGCGUGUCGGGUCUAAUGUU-ACACCGUACCUCUUUGG-----
RS0802	-----UCUGCGUGUCGGGUCUAAUGUU-ACACCGUACCUCUUUGG-----
RS0811	-----UCUGCGUGUCGGGUCUAAUGUU-ACACCGUACCUCUUUGG-----
RE0506	-----ACGUUACGGGCUAAGUUUUUGCCCUAUCUCUAUUUGGGGG-----
RE0625	-----CGGUUUGUACACUUAUGAU--UUCGCCCUAUCCUUGCGGGCG-----
RS0414	-----GCAGAAUUUGGGCUCUUUCGUU-AUUCGGUGUAUUAUUUGG-----
RE0533	-----UAUUUAAUACACGGCACUAUUGCUGCAUUCCGUUCCAUGG-----
RS0114	-----CCCGCCGUAGUUUAUCCACGGAUAUCUUGCCGACUGCCGG-----
RE0616	-----CUUCGUAGAUUUGGUAGCCCGG---CGUAGUGUGCUCUCCUCUG-----
RS0128	-----AAUGAGUUUGGUCACCUCGGGCCGUCGUUCCUGCCUAU-----
RE0313	-----UAUUGUGGUCAAACGGCCGUUCAUAUCUGGCUAAUGUC-----
RE0703	-----GCUAUUCGGAUUAUUGCUUUUUCAGCACAGUUUAUGUUG-----
RS0407	-----UGCUAAUAGACUUCUGCAUCUCCA-UGCCCGCGUAUCUGG-----
RE0215	-----UACGUUACAUGUAGUGA---GCUCGCAUUUCUUCUGGUGUUGU-----
RE0401	-----CCAAUGUUA-AUGGGGUGU---GUCGUGUACUGUGUACCGGG-----
RE0315	-----CCCGUCUAAAGUACUUG--AGUCGUUCUGCUGUGUCUGUGG-----
RS0640	-----GUGUAGAGAGUAACUGCCAGUGGUUGGGUUUGUUGUGUG-----
RS0318	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGG---CGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0319	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGG---CGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0320	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGG---CGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0323	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGG---CGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0325	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGG---CGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RS0327	-----ACUGUGUCAUAUAGAGCGG---CGUGUGUGCUAAAUUCUGCAC-----
RE0301	-----UGAGUCCGAUGGAG-GC---CGU-CGUUGUGAGCUGUUCGUGUG-----
RE0601	-----UAGUUUGAUCUAUAUCGUCCAUAUCCUCUGUACUCUGCACG-----
RS0701	-----UAUUGCGCCACUGCGCCUGGAU-UUUGUAAUAUUUGUGCG-----
RS0124	-----CUGCUCGGGCGCGUUUAGGU-UCGUUUUAUACCGUGCAGUC-----
RS0612	-----AGUUGAUCGAGUG-GUCUGGGU-A-AUCGUUGACCAUGCCGUG-----
RS0706	-----UUAAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCG-UCGGUUUGUUG-----

8. APÉNDICES

RS0707	-----UUAAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCG-UCGGUUUGUUG-----
RS0710	-----UUAAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCG-UCGGUUUGUUG-----
RS0521	-----UAAUUUGUUCAAAGUAUCGGGUCCGGUGGCCUCCUUUUG-----
RS0608	-----UUCUUAUCGAUUG---GUCGGGGUCGCCCCGAUGUCUCCCGUG-----
RS0633	-----UCUACUCAAUUGAGGGGUCGGGGUGGUCUUGUUUCCCGUG-----
RE0323	-----GACAUUGAAGGGUCUCGUUCGUAGUCU-GUGAGAUUCGUUG-----
RS0103	-----GCCAAACAUUGUCUUUCGUAGCCUUGCGAAAAUCUUUGUU-----
RE0519	-----UCUAACGUGUCGCACCUGGCCU-GCCGAUAUCUCUGCGUGG-----
RS0208	-----CGCUACACUGUCGCUUGUGGCUU-AUCUAAUUCGCUG-GUGG-----
RS0620	-----UGUGGCAUAG-ACCUAAUUCGCGGAACUGUGUAACCCGGG-----
RS0624	-----UGUGGCAUAG-ACCUAAUUCGCGGAACUGUGUAACCCGGG-----
RS0627	-----UGUGGCAUAG-ACCUAAUUCGCGGAACUGUGUAACCCGGG-----
RS0628	-----UGUGGCAUAG-ACCUAAUUCGCGGAACUGUGUAACCCGGG-----
RS0629	-----UGUGGCAUAG-ACCUAAUUCGCGGAACUGUGUAACCCGGG-----
RS0632	-----UGUGGCAUAG-ACCUAAUUCGCGGAACUGUGUAACCCGGG-----
RE0804	-----ACUGUCCCAUAG-GUAUG--UCUGCGGGAGUCUUUAACGUUUG-----
RE0110	-----UUGGCGACCACUUUCGAGGGUACUUAUAUUCCGAUUGCA-----
RS0410	-----GAGCACGGCUACAACUUUCGGGUU--UGCUCUUAGAAUCG-----
RS0611	-----CGGCAGCGCGGUUGCCGUGUCCGUAAUUCUUCUUUUG-----
RS0614	-----GCGGUGUUGCCGUGGUCAUUUGCAUUCUUAUUAUACAUUGG-----
RE0522	-----GGCGCGCCAUCGCGGUUCAUGUAUUCUAGUAGGAAUGGCG-----
RE0331	-----UCCGAUUAGAGCUCAAGCUUUCACUU-CAACUUUUUG-GGUG-----
RE0335	-----UCCGAUUAGAGCUCAAGCUUUCACUU-CAACUUUUUG-GGUG-----
RE0111	-----GUUACAGAGCAGGCUUUAUGUAUAAUUAUUUGCGGUGGU-----
RS0631	-----UUGAGGGACUUUAACACUUAUCUUUCAGUCCUACCUGAG-----
RE0714	-----CCAUGC UUCCUAAUCUUUAAGUCGUUCUCCUUAUGCGCG-----
RE0231	-----ACUUGAGGUUUGCACUUUAUCCAUAGACUCUACGACGGG-----
RE0120	-----ACUGUAAUAUCAUUGAUGAGUUUCGUUG--CAUUACAUGG-----
RE0126	-----ACUGUAAUAUCAUUGAUGAGUUUCGUUG--CAUUACAUGG-----
RS0416	-----GUUUUAG-AUUUCCUGCGAUCCGGUUA--AGUUACAUGUGCG-----
RS0728	-----AUAUGCAAGGAACGUCAUCCGGUUAUGUUAUCGCACGGCCG-----
RE0630	-----UCGGCAGGGUCCAAAAGUUUCAUUGCGA-GUCUGUCGUCG-----
RS0127	-----GGCAAAAGUUUAAGUUGCGAGUCGUCGACUGUCGUAGGG-----
RS0301	-----GACAUUA-GCUUGAUUCGCGAUUCGGUGCCUUAACCCAGUG-----
RE0122	-----GUACGGGAAGUUAUCUAGAUAGCUCUGCUGUUAUGUCA-----
RE0232	-----CCGGGUAAAUGCUUUGGGGAGCUGUGCUAAUG-UGCAGGCC-----
RE0125	-----AGGUUACAAAGCUUUGCUU-CAUUCCGAUACC--UU-UGCUGGC-----
RS0524	-----CGAGAGAUUUGCUUGUAUCCAGGUACAGAUG-UGCUGGUG-----
RE0204	-----GCGAUUAUGGGGCGCAAC--UUCACCAAUCUGGUUAGCUGUG-----
RE0208	-----GCGAUUAUGGGGCGCAAC--UUCACCAAUCUGGUUAGCUGUG-----

8. APÉNDICES

RE0217	-----GCGAUUAUGGGGCGCAAC--UUCACCAAUCUGGUUAGCUGUG-----
RS0230	-----AUGUUAUAUUUAUUGGGUGGAUCGGUCCACCCUCUCUGUG-----
RE0825	-----UGGUUAUAAUGGUUGCC--UUCAGCGGUCGGGUAAGCGUGG-----
RS0425	-----GGCGUGCACCAUAAUGGUU--UUC---GGUCCGGUUGCCGUGUUG----
RE0224	-----CUCUCGCCUUACUGGUGUGCCU-UUUUUUCACGUCGUAGUG-----
RE0719	-----CUCCUCAGGUCACGCCU-UCUCGUUA-GACGUGGCUUUUGG-----
RS0517	-----CGGGGUUGCAGUUACUGGUCAGCU-UUCGACAAGACGGUGG-----
RS0518	-----CGGGGUUGCAGUUACUGGUCAGCU-UUCGACAAGACGGUGG-----
RE0508	-----GUCGAGUUGACGUAAGAGGUU--CC-AUCUGUUGACCACUGG-----
RS0702	-----CAGUUCUGCAAUUAUGGACGUAGCGUUGAUUUCCCGUCG-----
RS0709	-----CAGUUCUGCAAUUAUGGACGUAGCGUUGAUUUCCCGUCG-----
RE0512	-----GAAGUGAUGUAGUUACAGCAGUAGCCGUUCAAUACUGCG-----
RS0716	-----CAUCGAAUGUGUCGUUGUUUGACUUUCAGCAGUACCCGUG-----
RS0717	-----CAUCGAAUGUGUCGUUGUUUGACUUUCAGCAGUACCCGUG-----
RS0308	-----AAUACUCAUCUAAAUGCCGUU-CUCGAGUUU--GCAGUCUCC-----
RE0117	-----UAUCUAUUACUCAAGAGCGUGUCGUUCGUUAUGACAAUG-----
RE0422	-----UA-CUCUUAUCUACAACCAUGAUGUGGGCGUUUACGAUAUG-----
RE0202	-----CUGCCUUACU-GUAAUUGCGUGCAGAAUGGCCAUGUUGCG-----
RE0517	-----GGCAUUAGUAGUCUUUUCUGGUAGAAUGGUUUGUACGGG-----
RE0123	-----GUGUCACGAGUUUAGUGACUUUAAACAGCAAUCAGCGUGU-----
RS0803	-----CUCCGAGUUGCGUUUGUAACGCCUGU--CAACGAUGAGUGCG-----
RE0303	-----AGCCGGGUUGGAGAUAAUCGCUUUUGAUUGAGUUGUCUGG-----
RE0317	-----AGCCGGGUUGGAGAUAAUCGCUUUUGAUUGAGUUGUCUGG-----
RE0821	-----AAGAACGAAGACGGUUUAGGAGUC-UGUCUUUUCACUGUG-----
RE0421	-----AGCC--UUCGGUUAUAGUGCCUCACAUUUGCUGUGACCUGCG-----
RE0626	-----GUGCCACGGUCUGAGCGCCUUUGACUCAGGCUUACCUGCG-----
RE0727	-----AUUGUUAGCCGCUUAGUCCAGUCAUUAACUGCU-AUCGGGG-----
RE0415	-----UUGCCGCUUACGUGCG-UGAUUUGGCAGUCCCUUGUCCGUGU-----
RS0109	-----UACGCGUACCUACA AUGAGUGGUUGUGAUGUGUCCUUUGC-----
RE0731	-----GCCCCGGGCGCGCUAUGCGCCUUAGUCAUGCGAUCCUUUG-----
RE0705	-----AUACUACUGCAGAGGGUGCUU--CGCUCCUUCACCUUCGGCG-----
RS0724	-----AAAACUCCAUUGGGUCUUUGUACUUGCUUACCUUCGGGG-----
RE0104	-----GGUGAGCUGUCGUGUGAGC---UACGUGUCGUCGUUUGCCGC-----
RS0101	-----GUGA-CUCUCGCGUGAUCA--UACAUGCGUUUCCCUUCGCGU-----
RE0530	-----UUCCCACGCUUUAACAGCUACGGGCGCCUCCGUCUCCUGG-----
RE0609	-----GUUAGCAUAUCGCGGCUGAUCAG-UGCGAGAAUUGUUGUUG-----
RE0624	-----UAGGAAUACACAUC-CGGCUUAACUA-CGCGUGCAUC--CGUUG-----
RE0130	-----AGCUGGCUACCUUAUC--GCGGUGUCGCUCCCGUCGUUGG-----
RS0502	-----AGUUCUUUUCAGUGCU--GUCAAGUUCUCGCGUUUGCUUGG-----
RS0226	-----GCGGCCUUCAUUUUU--GGUACAUCCACGUCGUGUUUGUUG-----

8. APÉNDICES

RS0420	-----ACCGCCGUA AUGCCA--GGUAGGCAU UCCUCGGGUUUUUUUG-----
RE0513	-----ACGCGUGUUAGGCAUAGUGCCUCGAGUUAUCCUGCGUGCG-----
RE0526	-----CCUGUUUCCGGCACA-UGCUUCGGGGUGUC-UCCGUCCGUG-----
RS0131	-----GUGC-UACCAGCAUGGCUCGAUUUCUUGUGGUGCCUCGACC-----
RS0606	-----UAGCACA UCCACCAAGUACCGAUG-CGUGAGGUGUCUCUG-----
RE0128	-----UGGGUAUUCGUG-AGCAUC-UCCUGAUUUCGUCGCCGGCGCC-----
RS0601	-----UUUUCGUGUGGUAUCGUCAGGAUUGCGCGGUGUCUUUUCG-----
RE0324	-----CGCCUUCUUCGUGUUAGUGAUGGUAAGUAACAUGCUCGGG-----
RS0104	-----UAAAAUGGGUAAUGGUAUGAUGCUCGCAUGCCCCC-----
RE0305	-----GAUGCGGCUUUACGU--UUGCAGAUAGUUAUA AUGCUUGC-----
RE0409	-----GAGAGGGUGGUUUUCGUCACUUGCCCAUGU-GUGAUACUG-----
RE0228	-----CGGAUUUUUGUACAUGCCUAUUCAAACACAUC-UCUCUGGG-----
RE0510	-----UGACUUGU-UUCGUGGCUUUGCGACCAAUUCGUCGGUGGG-----
RE0404	-----UUACAGAUCUCGGGGCGUCUCUCCGAU-ACUCCUAUGUUG-----
RE0615	-----GUACUUACCUUUAUCGAGGCGAUUUCUCGAG-GAUCUGUC-----
RE0203	-----UUCUACUGUCCGGCUUACAUUACUUGUCUUUCUGUUGG-----
RS0821	-----GCUUUAUUCUA-UGUACGUCUUAUCAG-AGUGGUCUUUGCG-----
RS0130	-----CAUCCUACGUCGCGUAUAACAUGAGGUGUGCGUCUUGCA-----
RS0303	-----UGGUUGUGUCUACCUACGCGCGGAUCGCGGAAUC-ACUGUC-----
RS0310	-----UAUGUUAUCUCAUUCUUCGCGCG--UCGCAUAAUUGCUGUG-----
RE0618	-----GUA--GUAUUCGCAUUGCUUUAACUGUGUUCCCUACCCGCG-----
RS0113	-----UUGUUAGGCCUAU-GAAUUCUUCGUGGCU--ACUAUAGUCCCU-----
RE0222	-----AUCGCUUACUAUGCUACCGCCGGGCGGGACCGGGACCUGC-----
RE0319	-----UUCUCGAUGGCUCUCGCCACGCAACGCUUUAUCACAACG-----
RS0431	-----GAGUGCUCCCCAAACUAGUAUCUAUUGCAAGUUAACGGUG
RE0511	-----CCCUACGUCUCUAUGUUCUGCCCCGGGAUGCGCUGUU-UG-----
RE0614	-----UUAAAGCGUAAAUUCGCGCCACGUAAUCAGGUGUUGUG-----
RE0236	-----CUUGAAAGGCCGAUCGUAGAUGUGCCC-CUUCCUAUCCUCC-----
RS0813	-----CCACGUUCAUAAGUCCUAACAU-GAUGUCCCCACUACCUG-----
RS0335	-----GGUGUCUCGUUCUUAUUAUGUACCU-UCCCUUGCCGAUCCUG-----
RS0336	-----GGUGUCUCGUUCUUAUUAUGUACCU-UCCCUUGCCGAUCCUG-----
RS0807	-----UGUUCAUUAUUGCAUGCAUCU-CUUCCAAUCUCUCCUGGG-----
RS0506	-----CGAGACAGCUAAAAUCGUAAUUGUCCCC--UGCGUGCCGUCC-----
RS0508	-----CGAGACAGCUAAAAUCGUAAUUGUCCCC--UGCGUGCCGUCC-----
RS0511	-----CGAGACAGCUAAAAUCGUAAUUGUCCCC--UGCGUGCCGUCC-----
RS0513	-----CGAGACAGCUAAAAUCGUAAUUGUCCCC--UGCGUGCCGUCC-----
RE0532	-----AUAUGCACUGACAGCACC GAUGAUAAU UCCAC--AGCGG-----
RE0507	-----AGCUGCCCUUAAUUCGCGUAUCCAUUGCCCGUAACGUCG-----
RE0521	-----AGCUGCCCUUAAUUCGCGUAUCCAUUGCCCGUAACGUCG-----
RE0431	-----UAGCUGCCUAUUCCAUUAUGUACCCUUGCCCCCGCAGUG-----

8. APÉNDICES

RS0329	-----UUACUGAGUAUUCUCCAGUGUACCCCCUCUAUUUC--UUG-----
RS0330	-----UUACUGAGUAUUCUCCAGUGUACCCCCUCUAUUUC--UUG-----
RS0413	-----GAGGGACUAAUACGUGCGGAUCCUUGAGAGUACCAUUG-----
RE0105	-----UUUUACCACCGAAUGGCUAUGUAUUCUUUUGUGGUGGCCU-----
RE0805	-----UCCAUCGUGUACCUACCUAGGACGCUCCAUUCUCUUGUGG-----
RE0424	-----AGCGGCAGCUCGUGACUCCCAAUAGAGCUCUAUACUGUGG-----
RE0309	-----UUUCGGCACCCAGGUUCCAUCUCGGCUGUAUCAU--GGGUG-----
RE0822	-----CAAGAUGCUGGUGCCAAAUCUCGCUCGAUGUA--UGGUGGCG-----
RS0711	-----UCAUCCAGACAGUCUCUAUGAUGCUCAAUAUCU--CGGUUG-----
RE0114	-----GAGAUUGAGCUAUCGCCGGUGCAUCUUGUUAUUCGUCCGG-----
RS0512	-----CUUUCGAGCUAC--GCGCUGCGCCUAGCUUUCUUCGUGG-----
RE0423	-----ACGGGAAAACAUCGGGCUAGACUU--GGUCGUUUCGGUG-----
RS0203	-----CUGAGUUUAGAGCGGGCCGAGAUUUCGACUCUGCCGGU-----
RS0621	-----UCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUAUGUUCUUCG-----
RS0625	-----UCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUAUGUUCUUCG-----
RS0626	-----UCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUAUGUUCUUCG-----
RE0219	-----AUCCGGUGAGUCCUGCGUU--GGGCGCCGAGCUUUAUCGUG-----
RE0304	-----GCGAGUUUGGGCUUCGAGUUCGACUG----ACAGAAACUCCGCG-----
RE0318	-----GCGAGUUUGGGCUUCGAGUUCGACUG----ACAGAAACUCCGCG-----
RS0528	-----UACUUCGAGCUAAAGGCCGAC-----GCUGAACCUCGGACUGG-----
RE0722	-----UGUUACUUUAAAGGUCCUGGGUACCAAUUCACUUCUGGG-----
RE0828	-----UAUUCAUGAUCCUCAGUCCCCUAUCACUUCCAGGGCG-----
RS0504	-----UAUUUUGAUCUUCUAAGUCGCCCCUCCCCAUAACCCUGC-----
RS0505	-----UAUUUUGAUCUUCUAAGUCGCCCCUCCCCAUAACCCUGC-----
RS0516	-----UAUUUUGAUCUUCUAAGUCGCCCCUCCCCAUAACCCUGC-----
RE0237	-----GUCCGCUCGUACCCUGCAGGGGAGACG--UUGCGCUU--GUUG-----
RE0634	-----CGUUGCUGGUUGCCU--CGGGGGAUAUG--UCUUGUUUUGUGG-----
RS0212	-----GUCCUCGACUCCGAUCCGUCGGGGGAUAAG--UGGUUGUGUA-----
RE0603	-----UGGAUAUGUGGUCUGUAAGC--GUUCCAUCUACCUUCUUGG-----
RS0527	-----UAAUAUCUCG--CUGGAGGCUAGGUCGCUCUUACUUGCC-----
RE0807	-----UCAGGCCGGAGAUACAACGACACAUAACGUUCUUCUUCG-----
RS0402	-----CAUAG--GGCGAUGCAG--GACACUU--CGCCUAUUAUUGCUUUG-----
RE0711	-----CUUGUGGUGUUGGGCGGACCAUGCAAACGCUGCAUUGUGG-----
RS0121	-----GAUACCUUACCG--CGGAUCAGGCA--UGCUGAUUGUGUUCU-----
RS0209	-----ACGACCGGUCGGACUAUCAUAUUGGUUAUGUCCUCCUGUG-----
RS0331	-----CGGACGGGAGGAAGCAUUUAGGUAUUGUGUUAUCUUGUG-----
RE0410	-----AAAACGACUACUCAGCAUAAGCGAUUAAUUGUGGUGCUCC-----
RE0802	-----UCCCAAUUCAGAGUC--GGCACCACUUUAC--UGUGCGUUGUGG-----
RS0224	-----CAAUCCAGGGUCCUCGACGCCACGUUAU--UGUCGUCCGUGG-----
RS0514	-----ACGUCCAGCGCGGGGGACACUAAGCUAUACAUAUGUUCUUG-----

8. APÉNDICES

RS0520	-----ACGUCCAGCGCGGGGACACUAAGCUAUACAUAUGUUCUUG-----
RE0220	-----CAUGAGUGCACGGUCAUAGACCUUUAACGCAUAUUUUGG-----
RS0309	-----UAUAUGUCGUCUCCGUCCAAAACCUUAUA-CUCAUACCUUG-----
RE0806	-----AAGACCCUUAUCAAGAACUUUCCCGCGCCUGU---UGCCUGG-----
RS0729	-----GUUUUAUCCUGAACUUUAACCGCCUAUCUCUGUCCGGGG-----
RE0233	-----CGCUCCUCGACUCA-UUGUAUCCG--AUU-CUGCAUGCCCUUG-----
RS0630	-----AUCCCGAUCUUACUUGUAAACGGUAUU-CUGGACAUCUUG-----
RE0604	-----ACAUCGGCGACUCU---ACUUGUUCUCCAGCAAAACUUGUUUG-----
RS0423	-----UCCGCGAGUCUGUACCCUUUUUCCAGCCAGGAGCUUUGG-----
RE0622	-----GAUACCCGGGCAAUACCUCUAUACAGUUUAACUCCGCGGG-----
RS0312	-----ACGCAAGAUCCCGAAACAAGAUCAACUAGUGUUUCCGACG-----
RE0817	-----AUCUGGCACGCUUACGUCU-CACAAUCUAA-UCCUUCGUGG-----
RS0307	-----CUAAGAUCGGCUUGCCUCU-UGCUCUCUAAUCCGUCACCC-----
RE0115	-----UAUG-CCGGUGCAGUU-GGGCGUGCUCGGAUUG-GGUAUUCGG-----
RS0108	-----GGUCUG-CCGGCGUGCCCCGGGUGUGGUU--AUUGCAACAGUC-----
RE0608	-----GUAUGAUCAACGUUUCUCGGAUGGGAUG--UUCGCUCUUGG-----
RS0225	-----AUUUAGGGGAAAAGUUUAGACGCUCCGGAGUCACGAGCC-----
RS0304	-----UCAGCUAGCCAGAAGGUCUUGGC-CGCAUGGUGUCUCUGG-----
RE0235	-----CAU-CGCAACGGGCCGGUUCGCGGGUCGUCCUUCUGUGGG-----
RE0509	-----AUACAUGUCUGGCCCGGAUGUUGGUCAGCCUACUGCGGUG-----
RS0636	-----GCUGUUUUAGACCGCUUGUUCCAGGU-ACGCGUCUGCCGG-----
RE0306	-----GGCAGC--CUAUUACUAGUCGGGCCCGUUGGUCAACUCUCC-----
RE0715	-----UCGAACAGCGUCUAUUGCCCAGUCGUGGCCCCUUGUUACG-----
RE0413	-----GUAUGGUGUUCGUAUUCGCGCGACGUUGUCCGAGUCGUGG-----
RE0420	-----GAUCGUGUGAUGUCCCUACUAGCAGGCGGUUGUACGGUG-----
RE0406	-----CGUCUUCUCUAUUCGCUAUUCGGCUU-CUCCAACGCUGUCG-----
RE0429	-----CGUCUUCUCUAUUCGCUAUUCGGCUU-CUCCAACGCUGUCG-----
RS0823	-----UUACGUAAUAAGCCAUCUGUCUCACUCGUAGGCUGUGGG-----
RE0612	-----GUUGCUUCCGUAUGCUAAUAUCCAUAUACCUCGCCUCGUCCC-----
RE0823	-----GCGUGUUCGUCACGAUUGGGUUCGAAGUCUAUGUCCUGG-----
RS0313	-----GACGAUGGCUCGUAUGUCGGCUUUGCCCCUCAUCCUCCCC-----
RE0113	-----GGUCGAAUGGG-AUCAGCCAGUGGUA-GUGGAGAAUUUAAUG-----
RS0727	-----UGUGGGCAUCCGCGUGAGGCAUAAGGAAAACUUAUGUCG-----
RE0229	-----UAAACAUUUUUCCAGCUGGGGUUAUCCUGGAACGGCGAGG-----
RS0818	-----AACAGCUUCCCGCUUCGGUAUUCAGAGUAUUUCAGUUCG-----
RS0204	-----GUGCUAAUAUCUCCCUU-AGGUAAU-AGAGACUUUAAUUUUG-----
RS0231	-----GCUUGCUGUUCUCCUUUAGGCUUU-UAUGAACGUUAUGUGG-----
RE0316	-----UAUUUGCUGGAAG-GGGCAAUUUCGUAGGAAUUUCUGUGG-----
RE0504	-----UGGUCGAUACAGCUGG-AAUCCACUGUGUAGGAAUGCGGGU-----
RE0328	-----CAGCGGCAGUUAGUAUUCUCCGCUCUAGGGACUCUCCGCC-----

8. APÉNDICES

RS0122	-----AAUAGUUGUGGUUCCGCUGUCUUGGGAAGUUAACCCUCAG-----
RS0409	-----UGGGGGCUACCAGUUGAAUAGUAGGUAGUAGUUCCTCUG-----
RE0119	-----GAGCGACUCGCAGUCGCACGCUGGCCGAACGUUUUGUGCC-----
RE0129	-----GAGCGACUCGCAGUCGCACGCUGGCCGAACGUUUUGUGCC-----
RE0206	-----GUCGACCGAUGGACUCACAU--GACGCCCUGUCUGUACGGUU-----
RS0831	-----GCGGAGCGAC--GGCAGUCAAAUGACUGUUCUGUGUAUUGG-----
RS0832	-----GCGGAGCGAC--GGCAGUCAAAUGACUGUUCUGUGUAUUGG-----
RE0321	-----GAUCCCGUAGGGCCGGUAGCAGA--UCGCUGUGUUCUGUGG-----
RE0602	-----AGCAAGAAGGACCGUUGCGGAUAGUUUGGUUCGUUCGUG-----
RS0321	-----AUUGGUUAUCCGCCAGCCGGGUGGCCGCUCUUGUGGCUUUG-----
RS0501	-----UCAAGUCCUCUGAAUCAGCGGUGAGGCAGGUUGCUUUGG-----
RE0124	-----AUUCAGGUCGUACUGAUGAGUAUAACGUUGGUUAUUUGUG-----
RE0131	-----AUUCAGGUCGUACUGAUGAGUAUAACGUUGGUUAUUUGUG-----
RS0129	-----GGGGUCCUCGCUCUGAAGCGC--UCAUGAUCUUUAAUUGCU-----
RE0606	-----CAGGUUAGAACACAUGCACUAUAAGGUGAUGCGUGCUGGG-----
RE0632	-----CUUACGGGUGAGCAGUUUAGAACCUACGCAC--AUAUGUUGG-----
RE0225	-----UAUCCCGGCGCAUAAAGGAC--CGUUGUCUCAGAACUCAUUGU-----
RE0718	-----AUCAUAAUG--CGUCGACCUGAAACCCAGGUGUUAUUGG-----
RE0617	-----AACCAGCAUAUCGACAGGUGCUUCAUAUAUCUAUCGUGG-----
RE0713	-----UAUCCGAUCGCAGGCGGUUUCUUAUAUCUAUCGUGCUUGG-----
RE0432	-----GUGCGGUUCUCGUGUCUCUACAGUGCUACACACUCAUGG-----
RE0820	-----GGAUAUCCAAGUCC--GCUUCUCUCUCUUGAUGGUCUCGGUG-----
RS0202	-----GACUUAACAAGUCAAGCUCCUAAUUCUGUUCGAUAGUGGUG-----
RS0210	-----UCUGCAGCACUCACUUCAAUGUCUACCAAAUAGUCACUGU-----
RE0121	-----GGUGCUGUCGUUGCUUAAUCAAAGUUAACGUUCGUGAUU-----
RS0117	-----UAAACGCACUCUUUGUUGAAGCAA--UAGCGUUCCTCGGUUC-----
RE0417	-----CGCGCUCUCGGUAGUCGUCUAAAGGGUAAAGGUCGAUUUGG-----
RS0332	-----GACCCCGCACUCGGCUUUGUUAAC--GUAAUUGUAUUUAG-----
RE0408	-----AAGCAA--UGGCCAUCUGUCUGCGCUCAGUAACCUCCUUCGG-----
RE0704	-----UCUAGGCAUCUGGGAAGCUGUAGACGAUCAACCACCCUCG-----
RE0501	-----UACGUCAUUGUGCA--CUGUAUCCACCGUAAUCUUAGUUGG-----
RS0119	-----AUCUGUUAUUGUUCGAAGCUGGUUAAACCGCACUCUU--UUG-----
RE0402	-----AGCCUGACUUGACUUUGUCUAUACCGGGU--ACGUUGUGGG-----
RE0428	-----AGCCUGACUUGACUUUGUCUAUACCGGGU--ACGUUGUGGG-----
RS0422	-----GAGUAUCCCUUUGUUGGUCUGUUUCUGCGG--ACGUUGUGG-----
RE0628	-----UGGUUCGUAGUCCUUGGGAGAGACCUGUUCGGGU--ACGUUG-----
RS0211	-----UGCACGUUUCUGGCUCUGCCGAGUCGGGGUAAAGUCGGG-----
RS0223	-----UGCACGUUUCUGGCUCUGCCGAGUCGGGGUAAAGUCGGG-----
RS0428	-----CACAUUUCUAGGUCUGUAUGGACCUGGUGGAAGUUGUG-----
RE0723	-----UACAGCGUCCACUGUGGUG--GGUGAGG--AUCUGCGGUGGGUG-----

8. APÉNDICES

RS0805	-----UCCUUACUCAGCCCAUAGUGAUCUGGUGAAGU--AAUUUGCG-----
RE0716	-----GCUGAUUAACCCGGUACUGCCGUGUCUCUGU--GGUCGGUGG-----
RS0215	-----CCAGCUAAUUAACGUGGGUCCCCUGCG---CUGG--AGUUGGUGG-----
RS0102	-----CUGACACGUUUGU-CUGCCGCUAGUGUGUCGGUACCUUAUG-----
RS0220	-----CUCUGGCGGUCCUGGGUUAGAACACGUAUGCUACUGUGCC-----
RE0720	-----CAGAGGAAGUAC-ACGCACUCUGGAUGUGGCUAGUCGUUGG-----
RE0201	-----CGGAACGAGUUAUUACGACGUUGUGGAAUUCUCUCGCUUG-----
RE0426	-----UGC UUAGUACGAAGACAUGGGAG-CGCCCCGUAAACUUGG-----
RE0528	-----CGUGCUAUUUGUUCAGUACUGUAAAAUUGGCGCGCUGG-----
RE0725	-----CGUGUGAUUGAUAGAGAAGUAUACCACGGAAUCGCCUGG-----
RE0234	-----GACGUGUUAAGAUGCGCCCGUGG-GAAUAUCAUAACGUG-----
RE0407	-----GUAAUAGAAAGUGCGUGUGUGGCGAAUAUCAAACCGGGC-----
RE0302	-----AAGGUUUCGUAGAACAUGUGACCGUGGCCAUUCCUCGGCG-----
RE0314	-----AAGGUUUCGUAGAACAUGUGACCGUGGCCAUUCCUCGGCG-----
RE0425	-----UUGCUAACCUUAUCUCGUCGGUCCCAGGGUAGAUUGUUGG-----
RE0629	-----AGUGCAAACCUUAUGCCGUCGUGC--GUGUCGAUUGUUGCG-----
RS0725	-----GGUCGGAGCAAAGUUAGAUUGUCGGGGACAUGAGUCGCG
RE0824	-----ACGGUCCGGCCACGACUAGCGCUGUUCUCGGUCUGGGGG-----
RE0830	-----ACGGUCCGGCCACGACUAGCGCUGUUCUCGGUCUGGGGG-----
RE0332	-----GAGACGGUUCGGACUUCA-UAGCGCGGUCCUUGUCACUGGG-----
RS0519	-----GACGUUCAGGGCACAGACUUAACCCUGGAACUGUGGGUG-----
RS0228	-----GGUAUUAAGCCGUGGGAGCAACUAACAAGGCGGUCCGUGU-----
RS0426	-----ACUGUACCGUUAACUUGGGUG-AUCUAACA--GUGGUGGG-----
DS0331	-----AGGGCCCTGCCTC-TCGGGAGGAGGTGAACTCGCTGGCAT-----
RS0424	-----AGUGUCCUGAGUCGUCAACAGGUGGUGGUUUGUCCACUG-----
DS0705	-----GGAGGACCAAGATGGGGAGCGGGTGC-TAGCTACAGTTTC-----
RS0111	-----UCCGGGACCAGUGCGUGGGCCUGGCGGUACAUACAUGG-----
00DINI36	-----CGACTTAAGTAGAAGTCATTCGGCTGGGGGATACCTTCTG-----
DE0618	-----TTATCAGTGTCGCGTCAGGTATCAAAGTAGTCTCATCCTC-----
RS0305	-----CUCUGUGCAGGCCCGGUUGGAAAGAAUUAUUAACUCCCGCG-----

Tabla A6. Secuencia y estructura *dot-bracket* de las moléculas presentes en la población inicial (00DINI) y en las rondas de los diferentes procesos. Estas estructuras se obtuvieron mediante mfold (para DNA) y RNAfold (RNA). Los dos números finales del nombre hacen referencia al número concreto del aptámero individual clonado. En las secuencias (excepto en 00DINI) se han señalado los motivos de secuencia/estructura que podrían estar implicados en la unión a Ebp1 de los aptámeros de DNA (TCTA, verde; TGTA, turquesa; GTGA, fucsia; TGTC, amarillo; y TGTT, gris) y de RNA (CGUA, rojo; GUGG, gris; GCUC, amarillo; GAUA, turquesa; UGUU, verde; CCUG, fucsia; UUCA, verde azulado; y GAUG, verde oliva). Ver texto principal para más detalles.

Nombre	Secuencia 5'-3'
00DINI01	GCGGATCCAGACTGGTGTTAATCCAGAACTAGCCCTCCGCCCTCACTTAATGATGTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((((.....((((.....)))).....))))....((((.....)))).....((((.....)))
00DINI02	GCGGATCCAGACTGGTGTTGACTGATGAGCCGGTGTGTGTGATATGGTATTATTAGTGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((.((((.....))))..)).)).....((((.....)))
00DINI03	GCGGATCCAGACTGGTGTTCTATCAACCGTCTTTCACTGGATTGAGAAGGGTTTTTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((((.....)))).....)))).....((((.....)))).....
00DINI04	GCGGATCCAGACTGGTGTTCAAATGCAATCATGCTGGGACCGGAGGTGTTTGCTATTTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))....((((.....)))....((((.....)))....((((.....)))
00DINI05	GCGGATCCAGACTGGTGTTTACCCTTATTCTCCCGGATTCTTCGCGCTTAGGTCTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....
00DINI06	GCGGATCCAGACTGGTGTTAATGGTGGAATGGTATTTCCTTGGTTGTTGTGCTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....)))).....
00DINI07	GCGGATCCAGACTGGTGTTGGCCGTTAACCGTTCGTAGTGATAAGATTGGTTATGGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((.((((.....))))..)).).((((((.(.(((.....)).)).)))).....((((.....)))
00DINI08	GCGGATCCAGACTGGTGTTTACGTATTAGGCTTCGAGACACTAACGGTTATCAGTATCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....(((.(.(((.....))))..)))).....
00DINI09	GCGGATCCAGACTGGTGTTTGGTCATGCTGGAGCAGCTATGCTCGAGCAGTGCGGTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((((.....)))).....(((((((((.....)))).....)))).....((((.....))))..
00DINI10	GCGGATCCAGACTGGTGTTACGGTGATTGTCGTGCTCATTTTATTCTTTGGCTAGCTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....((((.....)))).....(((((((.....)))).....
00DINI11	GCGGATCCAGACTGGTGTTTACTGTACCTAAGACGGTGCGCCTCTCGTATGGATCCCGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((((((.(.(((.....)))).....)))).....)))).....((((.....)))
00DINI12	GCGGATCCAGACTGGTGTTCTGCAATGGAAGTACGCGCCTCACCATTCTGTTCAATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((((.....)))).....)))).....((((.....)))
00DINI13	GCGGATCCAGACTGGTGTTCCCGAGAGCCCTTCGTCCAGATCGGTTAAGTGACTAGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....((((.....)))).....((((.....)))
00DINI14	GCGGATCCAGACTGGTGTTCCGTGTGTGGCGTGGTTATTGAATTCGAGATAATGGCTTGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((.((((.....)))).....)))).....(((((((.....)))).....
00DINI15	GCGGATCCAGACTGGTGTTATCTTAGTTGACAATTCTTCGCTTGCGGACTTCTGACGCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....)))

8. APÉNDICES

00DINI16	GCGGATCCAGACTGGTGTCTGCGCCGGAATATTTCTAGTTAGTTTTGCGTATTGACCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((.....))))). (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI17	GCGGATCCAGACTGGTGTCCGGCATGATCGTACATCTTTTTGGTCCTCTTCATCACCGCCCTAAAGACAAGCTTC . (((((.....)))..))) (((((.....)))..))) (((((.....)))..))) (((((.....)))..)))
00DINI18	GCGGATCCAGACTGGTGTTCACGCGCAGTTTTTCTCATAGGTACGTGGCGTCTGAGAGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI19	GCGGATCCAGACTGGTGTCTATGTGTCTACATTTTCGTCCAGCGGGTTGAGGCGGTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI20	GCGGATCCAGACTGGTGTTACGTTAATTCATGTGTTAATGTGGACTTATCTGCGGAGGCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) ((((((.....)))))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI21	GCGGATCCAGACTGGTGTTCACAGTGCCCTGTATATCGCTATGCAATCCCCGGCAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI22	GCGGATCCAGACTGGTGTCTTAATAATCGTGGCATGAGAGGAACGAGTGCAGCAATCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI23	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCGACCTAACTTTAAGCTGTTGTCTATAAATATACCTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI24	GCGGATCCAGACTGGTGTTCCCGAGAGCCCTTCGTCCAGATCGGTTAAGTGACTAGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI25	GCGGATCCAGACTGGTGTGTATCCGTATCATGATTCGATCGTTGCCGGTTAAAGCGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC . (((((.....))))). (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI26	GCGGATCCAGACTGGTGTCTGCAATGGAAGTACGCGCCTCACCGATTCTGTTCAATGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI27	GCGGATCCAGACTGGTGTGTATCCTAGGTAGAGAGCGAGAAGGGAGCTCGCTTGGTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI28	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGTTATGAAATTATAGGCGTCTCGTAACTAGACGTTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI29	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGGGCTGACTAGATTGAGGACATATCTCCTGTATCCTTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI30	GCGGATCCAGACTGGTGTCCGTGTGGGCGTGGTTATTGAATTCGAGATAATGGCTTGCCCTAAAGACAAGCTTC . (((((.....))))). (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI31	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGAACCAGCTGAAATGGGGTGCCGCGCAGGATGTGCTTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI32	GCGGATCCAGACTGGTGTAAGGTTTAGTTCATTTACATGATGGGTTTTCTTCGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI33	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGATTTACATGATTTTGC GTTGTGGTACGGTGTGTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI34	GCGGATCCAGACTGGTGTTATTGTTATTTAGATATTTTGAATCCGAGTTGTGCTATTGCCCTAAAGACAAGCTTC . (((((.....))))). (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI35	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCTCACTTCTTATCTACTCGGTCATGCTGTTGGACAGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI36	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGACTTAAGTAGAAGTCATTCGGCTGGGGGATACCTTCTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
00DINI37	GCGGATCCAGACTGGTGTATGATTGCTTCATTGAAGTAGTAACGGTTTATGGATCGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .

00DINI38	GCGGATCCAGACTGGTGTGACGTGTACGAGTAGCGGTTAGATCAGGTTAACTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((...)).((((.....)))).....(((...))).....
00DINI39	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTTTTGTGATCAAGCTGGCTGCATGTGGATTGTTAAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((...))....((((.....)))).....(((.....)))....
00DINI40	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTCGCTTTTTCTAACTAAGACCGGAAATTCGTTTATGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))....(((.....)))....
00DINI41	GCGGATCCAGACTGGTGTGAACGCTCTTCGTATCACCTAATTCTGGTTGGGGGCCAGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....(((.....)))....))))....(((.....))....(((.....)))....
00DINI42	GCGGATCCAGACTGGTGTGATATTATATATTGCGTGAGATCGATACTCGTTATCGTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((...)).....((((.....)))).....(((.....)))....

341

8. APÉNDICES

DS0115	GCGGATCCAGACTGGTGTAGATGGGTCACTCTCGCTACATTTCTGCTTCTTCTGCCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((... ((...))...)))... ((((((...)))...)))... (((((...)))...)))... (((((...)))...)))...
DS0116	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCATTGAGGCTTTTGGACCGCGTCAAAAAGTCTACGTTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((...))... ((((((...)))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0117	GCGGATCCAGACTGGTGTACCAGCGTGTCTGACGGAGCCACTGGGGTTTCTCTATGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((...)))...)))... ((((((...)))...)))... (((((...)))...)))... (((((...)))...)))...
DS0118	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGGTGGCACATCATGGTCTGTAGAAATTTATGCTCTGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((...)))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0119	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGGTACTGGTCTAGTTTCCCGGAAGTCTGCGTACCCAGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((... ((...))...)))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0120	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTACAATCTCCTTAAGTCTAGTATTCATTGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((... ((...))...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0121	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCGGTGTTTTTCCATTGGGGTCAAGTGTATACCTGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0122	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTGGGGTACCGTGATCAATAAGGCCCTTATTTTATTAGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((... ((...))...)))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0123	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTCCACCTATCTCAGGAGATTCAGTGTGCCCGTGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((...))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0124	GCGGATCCAGACTGGTGTATCGGTGGACTACGACCAATTCTTAGTACATTGGGTACGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((...)))...)))... (((((...)))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0125	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTCATAGTTGCTCAATGGCTTCTGTGTCTCCGTGCTGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((... ((...))...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0126	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGCTGTGCACTCAGCTTACGCGCTAATAATTATGTGTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0127	GCGGATCCAGACTGGTGTCCCATACATAGCGTTACGCTGAGGCTAGCACTGCTTCCGGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((...))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0128	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCGCTAACTCGTTCTGTTTACATATCGCGAGCGCCATAGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((... ((...))...)))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0129	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCCGCTACGGCATGCGGCCGCTCACCTTTATTGGCAAGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((((((... ((...))...)))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0130	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGATGCGTAATTCAGGCTCACCTGTTCCATTTGTAGGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((... ((... ((...))...)))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0201	GCGGATCCAGACTGGTGTATCAGCCGATAATGCGGGCGCACCTTCTCATATTACAGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0202	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTCTATGTAAACTCTGTACATTGCGGAGTTGCTGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0203	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCATGTTGTGTGGTGCCCCAAAAGGTCCTAGTTGGACGGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0204	GCGGATCCAGACTGGTGTATGTTACATTGTTTCCATGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0205	GCGGATCCAGACTGGTGTATTGCGGTTGGGGGCTTAATTGTCTCATTCGCTTGTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...
DS0206	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTATTACGTTTGTGCGTATATGGCCTTTTCTCTATATGCCCTAAAGACAAGCTTC ... ((... ((...))...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))... ((...))...

8. APÉNDICES

DS0207	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTTCTATTTCGACGTGTAGGGCTAACAGTTGTTGAGCCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....
DS0208	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCTTACCCCTTCTGAACCTCAACTGGCCAGTTCTATCATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....))))..)))).....(((.....)))
DS0209	GCGGATCCAGACTGGTGTACATCTTCGGATAAAGAACACGCAGCTTCGCCACTTCGCAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....))))))..)((.....)).....(((.....)))
DS0210	GCGGATCCAGACTGGTGTATGTTACATTGTTTCCATGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....))).....
DS0211	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCCACTAGGAGTTTCGTTACGCTTTCGGGATGCGCGTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0212	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTCCCCTAATATAGGGTTCGGGAGGTGGGGAGTTTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))((((.....))).....(((.....)))..(((.....)))
DS0213	GCGGATCCAGACTGGTGTACCGACTGATCTACAATTTCCATGGAGGTCACTGCGCTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DS0214	GCGGATCCAGACTGGTGTACGCGATATTGAAGGTGCTTCACGCTGTTGCGTCTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....((((.....)))).....
DS0215	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTAGCGCGGTGAATCGCCATACCGTTGTAGGCTATTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DS0216	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGCCTAATAGTTGAGACTGTTTCGCTTACCTCATCCTGAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0217	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGATGTCCAACCACCTGGTTGGTGTATTCTGTGCGCCCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..(((((((.....)))))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0218	GCGGATCCAGACTGGTGTCCGATGTGGCAGTGCCCGTACCGGGTGCGCATTGCTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....((((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0219	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTCCTCTTACTGCTTTTATGCTATTAGGCGAGCGTGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....))).....((((.....)))).....
DS0220	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCGGGGTTTATTACTTCCCACTCTGTCAACATGATGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))(((((((.....)))))).....)))).....(((.....)))
DS0221	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGCTTTACTATCTTTCATGTTTCAGGTCTATAGCCTCAGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....)))).....
DS0222	GCGGATCCAGACTGGTGTATAACGTATTTGCTGCGCGCAATTATTTTCTCTGTTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....)))).....(((.....)))
DS0223	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCTTACCCCTTCTGAACCTCAACTGGCCAGTTCTATCATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....))))..)))).....((((.....)))
DS0224	GCGGATCCAGACTGGTGTGGACACTGATACTCGTCGAGCCGTCTCTAGAACTTAGATGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((((((.....)))))).....)))).....
DS0225	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATTTTAGCGCAGTGGCGGTTATGCGGGCGGAAGTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((((((.....))))))..(((.....)))
DS0226	GCGGATCCAGACTGGTGTATAAGTAGCCGGGGACATCTCGGGTTACGGGGGACTTGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....((((.....)))).....
DS0227	GCGGATCCAGACTGGTGTATGTTACATTGTTTCCATGCGTTGGATTCTTAGTGTAGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....((((.....))).....
DS0228	GCGGATCCAGACTGGTGTAGCTTTTCTGCATCCCGACTGGCTTAGAAAAAGGATGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....)))).....(((.....)))

8. APÉNDICES

DS0229	GCGGATCCAGACTGGT GTGA TGACCCCGTCAATATCCATGCGGATGTGTGCG TGTT CCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.(.((.....))..)))..(((.....)))....((.....))....((.....))..
DS0230	GCGGATCCAGACTGGT GTGA TGACCCCGTCAATATCCATGCGGATGTGTGCG TGTT CCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.(.((.....))..)))..(((.....)))....((.....))....((.....))..
DS0231	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTATTTGACACTCTTTGGGTTTGATTACCCCTATAAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))....(((.....))).....((.....))..
DS0232	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCACTAGGAGTTTCGTTACGCTTTCGGGATGCGCGTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....(((.....)))....((.....))..
DS0301	GCGGATCCAGACTGGTGTACTGTAACGTGGAGAACAGGTACCGTAGTTCACGCCGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))..(((.....)))..(((.....)))....((.....))..
DS0302	GCGGATCCAGACTGGTGTGACTGTTTCGAGGGTTACTGTGCCCAATGTTTGCCGTGCGCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))..(((.....)))....((.....))....((.....))..
DS0303	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGACTCGATATCAAGTGTTATGTCTCAATCATGTTTGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC ..((.(.(((.....))))..)).....((((.....)))).....
DS0304	GCGGATCCAGACTGGTGTGCAGTTCATATCCCCTCGACTCATGGTTGTAAATTCAGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....((.....))..((.....))..((.....))..
DS0305	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGGTATCTCACACAGGTGTGACGCGCAATTGCGTATCGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....(((.....)))....((.....))..
DS0306	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAGGCGTCCTTGATGGTGGCTCGTACTTCCCTTTGTGATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))..((.(.((.....))..))..)).....((((.....)))).....
DS0307	GCGGATCCAGACTGGTGTATGTGTGAATCCTTCCAGGTGCCCGTCTTGTGATTGCCCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))..((.(.(((.....))))..))...
DS0308	GCGGATCCAGACTGGTGTCTAGCAACAAGGTTCGCCCGGGAGACGTGAGACTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....))))))..))....((.....))..
DS0309	GCGGATCCAGACTGGT TGTT GTGTGGACCTCAGTTTATAGTAGGTTACAGATTTACACGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....((.....))..
DS0310	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCGCCTCGGCATTCTAGTTGGAATAGGACCTCTATAACGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.(.((.....))..)))..(((.(.((.....))..))..))....((.....))..
DS0311	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTGTGCTCCAGATTATTTGTTTAGTTTTATTCCAGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....((.....))..
DS0312	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTGACGGATATTTTAATTGAATCTCGTTTTCTCGAAAGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....(((.....)))..
DS0313	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCAGATGGCCTCAGAAGACGTATGGTCTAGATTGCGGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.(.(((.....))))..))....(((.....)))....((.....))....((.....))..
DS0314	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGACTTCATGTTAAATGGTTAGTTTAAATCTGTGACGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))..((.....))....(((.....)))....
DS0315	GCGGATCCAGACTGGTGTATATGATTTTCATCTCTAGAATATTGTCTTATTTATGGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))..((.....))....((((.....))))....
DS0316	GCGGATCCAGACTGGTGT TGTA CAGTGCTGCTTCGCTGAAGGCGTCATTCTGATATACGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....(((.....))..((.....))..
DS0317	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGGGATGCACGCTGCCGTAGACTACAGGACTTACCTCTCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))....(((.....))..((.....))....((.....))..
DS0318	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGTAGTGTGCACTACTATCTTTTATGCATTCCGCATTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))..(((((((.....))))))..((.....))....((.....))..

8. APÉNDICES

DS0319	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGTAGCTTTGACTCGCAGCTCGTATCTCTTGCCCGGTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0320	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGCATTCTTAACGACTACTACCGGACAGGGTCAATTCGCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....)))).....
DS0321	GCGGATCCAGACTGGTGTGAAATGTGATGCCTATTGGACCTGGCGGTGGCATCTTAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....((((.....))))))(((((.....)))))).....
DS0322	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCACAGACAATGATTGTTTGAGTGAAAGTACTTAGGTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....((.....((((.....)))).....)).....
DS0323	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGACAAATCCGGGTTAATGCTCGTTACACGTCCTCTCTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....((((.....))).....)))).....(((.....))).....(((.....)))
DS0324	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGACTACATCTTTGCTGATGACGGTTTGCTTTCCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0325	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTACGTCTTACCCACTCGTCGTTGTGTGTTATTCATGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0326	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCACAGACAATGATTGTTTGAGTGAAAGTACTTAGGTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....((.....((((.....)))).....)).....
DS0327	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTTATTATTATCCAGCCATTATCATGAACCTTTGGGATGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....))).....((((.....)))).....
DS0328	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGGGATGCACGCTGCCGTAGACTACAGGACTTACCTCTCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0329	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCCTGGCGTACTAATGATGGCGGCTCCAAAGTTCTACGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0330	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCCAGGTAGCTGAGGTTGAGTGCAGCACC CGAAGTTCAGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0331	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGGCCCTGCCTCTCGGGAGGAGGTGAACCTCGCTGGCATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....((((.....((((.....)))).....)))).....)).....
DS0401	GCGGATCCAGACTGGTGTATCGGCCTTCGTTGGAGTGCACACAATCCTGGTACACGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0402	GCGGATCCAGACTGGTGTGATGATCATTCTACCATCCCATACCTTCGCTTTTTCGCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....((((.....))).....)))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0403	GCGGATCCAGACTGGTGTCTATTGTCTATCTGAGCGTGCCGCTATTGTTCGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0404	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCGAGACGCCGTATGGTTTGTAGACTCCGTCCGTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....((((.....))).....)))).....(((.....)))
DS0405	GCGGATCCAGACTGGTGTACAGCGGTAGTGTGTGTGATGTAAGATACCATCTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0406	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCCATCTTGTGCCTGAAATTGCCTTATCGTATTCTCTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....((((.....)))).....
DS0407	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTAAACCTTTGCTTTTGTGGGTTGCTCCCATATCACGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0408	GCGGATCCAGACTGGTGTACTCCCTCCGCCACCAAAAGGTAGCCGCACTGTCTAAGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....))).....((.....((((.....)))).....)).....
DS0409	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCCTTTAATATGTCTTACTACCATTCTTAACAACACCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....((((.....)))).....)))).....(((.....)))

8. APÉNDICES

DS0410	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCGCAGGGGGTGCATTTAGACCACGGTGTGTTTGTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....(((.....)))))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0411	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGGGCTGCAAGCTGTAACATGCCGTTGTGCCCTCTCCCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..(((.....)))..(((.....))).....(((.....)))
DS0412	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGCTCAGCTAAGACAAGCGGGTTTTGATTCTACCTCGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....((((.....))))..(((.....)))
DS0413	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGGGATGACTCCCCTGTGTGAGTGACAGATCCTTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....((((.....)))).....
DS0414	GCGGATCCAGACTGGTGTGATGCCACTCTGAAATATGCATGTACGTTAACCCCTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....((((.....))))
DS0415	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTCCCGTTCTGGTTCGTGCGTCACATTGTTGTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....(((.....))))))..(((.....)))..(((.....))).....(((.....)))
DS0416	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGAGGCACAGGGTGCTGATGCACGTTTTGTTTGTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..((((.....))))..(((.....))).....(((.....)))
DS0417	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGAGGCACAGGGTGCTGATGCACGTTTTGTTTGTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..((((.....))))..(((.....))).....(((.....)))
DS0418	GCGGATCCAGACTGGTGTATATGTGTTTTTGACGATCGCTTGCCGTCCGTCATGTTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))..(((.....))).....(((.....)))
DS0419	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGGACCCAGTTGTTATTCGTCTAAGTGTTCTCCCTTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0420	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCCCTTTACCCCTCCTTTTCTGTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))..(((.....))).....((((.....)))).....
DS0421	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGTAGATATGTTAGTTTTCAGTAGTATTGCGTCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0422	GCGGATCCAGACTGGTGTGACATGTGGCCGCGGTACGAACTTTTTACCTTTTGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....(((.....))).....((((.....))))
DS0423	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTATTATTCGATGATGCTTACCCTCCCTTTCACACCTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((.....(((.....)))))).....(((.....)))
DS0424	GCGGATCCAGACTGGTGTGAAGACTTCTACTATCCGTTAACTTCCCGTTACGAACTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC ..((((.....)))).....(((.....))).....(((.....)))
DS0425	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTATTCATTTCATGTGTCAACTACGGTGACGCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))..(((.....))).....(((.....)))
DS0426	GCGGATCCAGACTGGTGTATATACTTAAGTTTTTACCTCCGATTATACTCCTATACCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))..(((.....)))
DS0427	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAATCCCTTTGGTATATCGTGCATCCCATGGGCTGCTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))))..(((.....)))
DS0428	GCGGATCCAGACTGGTGTACACATGTAACCGTTCGATCTAAACCCTGAGTCCTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..((((.....)))).....((((.....))))
DS0429	GCGGATCCAGACTGGTGTTCAGGTTCTACGCGCTCGACTTGCGCCCTCCTCTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....)))).....((((.....))))
DS0430	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAAGCATGCGATTTCGCCCTTCTCTGTCTGACCATCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..((((.....)))..(((.....)))
DS0431	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAGTATGGGTGGGCGGATAGTACTGCATTAAAGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..(((.....))).....((((.....))))..(((.....)))

8. APÉNDICES

DS0501	GCGGATCCAGACTGGTGTACACGCAGAACCTGTAATTATGTACAATCCACACCTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))...((((.....))))).(((.....))).
DS0502	GCGGATCCAGACTGGTGTGATTACTCTTATCTGCCATACAGCTGTGGGGTCAAGCTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....((((.....))))).
DS0503	GCGGATCCAGACTGGTGTAGCATATGCTCTCTTAATCGCGGTACTTCACCCGGAATGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))...((((.....))).....((((.....))))).
DS0504	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGCTGCGTCGGTCGTTACCGGTCCTTCATACTGCGTTACGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....((((.....))))).
DS0505	GCGGATCCAGACTGGTGTATATGCTATACTTGACCTGCTTCGCGCCCTCAGTACACAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).((((.....))).....((((.....))))).
DS0506	GCGGATCCAGACTGGTGTGCAGGTTTAAGTCTGCATGGCCCTCTATATTTCTGTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))))...((((.....)))...(((.....))).
DS0507	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGGAATGCGCAACTACTGCTAATGCCCGTAATTCGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....(((.....))))).)).).....((.....)).....((((.....))).
DS0508	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCGCTACGCACTGTGTAATCTAGATTAGTATACCCTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....((((.....))).....((((.....))).
DS0509	GCGGATCCAGACTGGTGTTCGCGCCCTTCATTTGCCGATATCGCCCGAGGAGGGGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((.....)).....((((.....))).....
DS0510	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTAGTTGATTATTGGTTTCTCTCCTATTAGCGTCGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....((((.....))).
DS0511	GCGGATCCAGACTGGTGTATATCTCACGACTATATACCCGACTTCGCCCTACTGGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((.....)).....((((.....))).....((((.....))).
DS0512	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTGAGTTGGGTTCTATTTGCCTCGTGGTTGAGTGCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....(((.....))))).)).).....((((.....)))).....((((.....))).
DS0513	GCGGATCCAGACTGGTGTGATTTATTCGCACAACGACAATTTCCCATAGGAGACAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))((((.....)))).....((.....)).....((((.....))).
DS0514	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTACTTCAATTCGTCCTTGATGAGGTCAGCAGACGTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....(((.....))))).)).).....((((.....))).
DS0515	GCGGATCCAGACTGGTGTAGCGGTGCTACTGCTTTCATCGCTGTTAATTTCTGGGAGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....((.....)).....((((.....))).
DS0516	GCGGATCCAGACTGGTGTGATTGGACGAGTTAATCGGAGTGGTGTACGACTTCAATGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).(((.....))).....((((.....))).
DS0517	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGACCGATCACACCTGTATACCTTAACCTATCCATAATTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....(((.....))))).)).).....((((.....))).....((((.....))).
DS0518	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGGTTACGGCTGGCGTAAATTCTTCGGTTAGTGTACTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC .(.((.....)).).).((((.....))).....((((.....))).
DS0519	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTGTAACCTGCATGCGTGATATTAATCCACTGAACCTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((.....)).....((((.....))).
DS0520	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCCTGATGGTACTACGATTTCCTATAGTGACCTACTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC((.....)).....((((.....))).....((((.....)))).
DS0521	GCGGATCCAGACTGGTGTCTAGAGTTTAGTCAATTGCTAATCTATAAGGCTCAATCGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....(((.....))))).)).).....
DS0522	GCGGATCCAGACTGGTGTACCTACAGTTGCGTCAATTGGGGATTTACCGGATTCGTCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((.....(((.....))))).)).).....

8. APÉNDICES

DS0523	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCAGTAGCAGGACTTAAACGTCATAGATCACTTTGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).(((.....)).)).....(((.....))).....
DS0524	GCGGATCCAGACTGGTGTGACGACTAAGGGGCTTACGACCTCATCTGCTTCTCAATAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))......(((.....))).....(((.....)))..(((.....)))..
DS0525	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCATTAGCAGATGCAATGTGGCAGGCACTGATTCGCCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))......(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0526	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGGATCGTTACAGGACCGACTGCATTTATGGCTCAGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ...(((.....)).)).....(((.....))).....(((.....))).....
DS0527	GCGGATCCAGACTGGTGTGGAGCGGTCAATCTACTGGGTACGCCTTCTACACGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0528	GCGGATCCAGACTGGTGTAAACATTGTGTAGATTATCTGCGTAGATACGATACGACCTAAAGACAAGCTTC(((.....))......(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0529	GCGGATCCAGACTGGTGTGACTGGGCGCTACATAGGCTTCGTAACGCTGTTGTTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))..(((.....))).....(((.....))).....
DS0530	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTTGGGTGTTACACGCCGTCGAAGTATAATGCATTCTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0531	GCGGATCCAGACTGGTGTAAAGCGGTGAAACGCTGTTCTACTCGATTATAAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))......(((.....))).....(((.....)))..
DS0601	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAGATGAGGGAAGAGCTCCAGTGTCTGCCGTGGTATGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))......(((.....))).....(((.....))).....
DS0602	GCGGATCCAGACTGGTGTGACGTTGGCTATGTTCCGGTCAAAGTTTAATATTTGTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0603	GCGGATCCAGACTGGTGTACTTACCTGTTACCCGGCTTCTCCGTGATATGACGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0604	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTCGCCTGCCCCAGGATTTTTTCAAGTGCCGTTAACTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....
DS0605	GCGGATCCAGACTGGTGTGCAACCCACTTCCGCAACCGCAGCGTGGAGGTGTATGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0606	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGAGTTTGGCAGTAATATAAATCATGAATCTCTTATGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0607	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATTCAGCCGATACCTAACAGCCTATTCATTACATTCGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0608	GCGGATCCAGACTGGTGTGACGGCATCCGACGGCTTAAGTGTCTTCTATATCTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0609	GCGGATCCAGACTGGTGTGATACAGTTGTCGCTGTATATAGCTCACATCTACCTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0610	GCGGATCCAGACTGGTGTCTAGATGACGGTGGCCACGAACACAGCTCAAATCTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0611	GCGGATCCAGACTGGTGTATTGTATTACGTACCTACTCTGGTGCTCGTGTATGTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))......(((.....))).....(((.....))).....
DS0612	GCGGATCCAGACTGGTGTACTCTCTGATAGTGAATACATAGATAGTATTTACTACGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DS0613	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCAAATGCTCTGTGTCATGGAGTGGCTTCCTATACTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))......(((.....))).....(((.....))).....

8. APÉNDICES

DS0614	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATCAGTTACTGTTTTTCTGCTCGGTTCTCATTTAGAGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((.....))) (((.....))) .
DS0615	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAGTCGCTGCTGAGTGCTACTTGGTCCTTAAATGGAGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((.....))) (((((((.....)))))) (((.....))) .
DS0616	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTCAATACTTCCACGGGTTCTTCATATGTGATTAAGTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0617	GCGGATCCAGACTGGTGTATATCCAGTGTCATCATCCATGCACTTGCAATCATGAGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))) (((.....))) (((.....))) .
DS0618	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCCACTTCAGCTCCTTTTTGTGTATGTGGACTGTTACCTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0619	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCAGGGTTGACTGCTGCTGTGTTGGACATCCTAACCTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((.....))) (((.....))) .
DS0620	GCGGATCCAGACTGGTGTACAACACGCGCCCTATGTAGGCTTATAGACTTGGAGTCTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0621	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTAATGTCCATCGGGTTTTTGGTGGACTTCGTTATTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0622	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCACTGGGACCGGCTGCCTTCTCTCACAATTGTTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))) (((.....))) (((.....))) .
DS0623	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTGTATAGACTTGTACCTCGCTCGTAACTTCTGAGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0624	GCGGATCCAGACTGGTGTGAACGCAACATCGACGGTATTATGTGTTCTTCGACTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0625	GCGGATCCAGACTGGTGTATTACACATTTGTACTCATGCAAATTGGTGTCTGTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))) (((((((.....)))) (((((((.....))))
DS0626	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGGCTCACCCTCTCGGACCAAGTATAATCTTCTAGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0627	GCGGATCCAGACTGGTGTCAAACCTCTATCGTTCTACAGTGCCCTATTCTCACATAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((((((.....))))
DS0628	GCGGATCCAGACTGGTGTAGATTTATTGGAGGTCACCGAAGCAGTATAAATTCGTGAGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0629	GCGGATCCAGACTGGTGTCTAGACGCTATAAATTGCGGACATTATTGAAATTACGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((.....))) (((.....))) .
DS0630	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTAGAGGTTCTTTGTGTAGGATGAATTACATTAACGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))) (((.....))) (((.....))) .
DS0631	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTAATCTTTTCACTATCGGGGAGCTGGCGTGGTTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0701	GCGGATCCAGACTGGTGTCCATAGGCTATACGCCACCGTTATGTTATGTGTTCTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))) (((.....))) (((((((.....))))
DS0702	GCGGATCCAGACTGGTGTATTTTGGTTTCATTGGCATGATTATCTGCTGAACCCGGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0703	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTGCCACAAGCACTCAGCCAATACGTGCCCTGAACTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((((((.....)))) (((.....))) .
DS0704	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGTGTTTCAGCGGAACGGTGTCCGTCTTAACCTATCTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))) (((((((.....))))

8. APÉNDICES

DS0705	GCGGATCCAGACTGGTGTGGAGGACCAAGATGGGGAGCGGGTGTAGCTACAGTTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) ... (((.....))) ... (((.....))) (((.....))) .
DS0706	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATTGTATCTGAGGTACTGGCGGCAACTTCTATTTCACGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) ... (((.....))) .
DS0707	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAAATAAGACATATTTGTGTGTTAGGCTCACTCTCATATGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) ... (((.....))) .
DS0708	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAAATAAGACATATTTGTGTGTTAGGCTCACTCTCATATGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) ... (((.....))) .
DS0709	GCGGATCCAGACTGGTGTAAAGTCGAGTCTTGTGTCTGACGGCTTATATGACTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) ... (((((((..... (((((((.....)))))))))))))) ...
DS0710	GCGGATCCAGACTGGTGTTCAGACCAGGTCGGCTTGTGCGAATATTTTCGCATGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) ... (((((((.....)))))))))))))) ...
DS0711	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTTTTGCGATCGCTTGCCGATTAGTTTTCTTCTTTGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))
DS0712	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGACGCGTATCGGCAAGTATCAATTACCGCTGTTTTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((.....))) .
DS0713	GCGGATCCAGACTGGTGTGATTGTCTGATGTTGAATTCCTTCTATACACGCTGGGACGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))
DS0714	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTTATGTCACCTGTTGCGAATATTATCATTTACTTCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC ((. (((((((.....)))))) .)) ... (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) .
DS0715	GCGGATCCAGACTGGTGTACGAAATTACCTTAGTAGCGCAAATTACTGGTGATCTGTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC .. ((. ((. (((.....))) .)) .)) (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) .
DS0716	GCGGATCCAGACTGGTGTATCTCGGACAATAAAATGCAGCATCGATGTCCACGTACGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((.....))) .
DS0717	GCGGATCCAGACTGGTGTCTTCGCGATTTCTTTAGTTTCACCTTCTCGTTGTTGTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))
DS0718	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAGACGTTGCAGGGCAGTCAATTTTCGCTTATTTCTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))
DS0719	GCGGATCCAGACTGGTGTACTGCTTTCTCCCTCAACATGCGCTTACGTTTGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((.....))) .
DS0720	GCGGATCCAGACTGGTGTATCAGTATATTATTTATGTTTATTTCGTACCTGAGTCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))
DS0721	GCGGATCCAGACTGGTGTGACTTCAACCTTGATAAGCTATGATTTCTCTTCGTTGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((((((.....))))))
DS0722	GCGGATCCAGACTGGTGTCCACTGCATTCTTTTTTAACCGACGTTACATCCTAGGACCGCCCTAAAGACAAGCTTC .. (((. (((.....))) .))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))
DS0723	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCTCTCTCGTTAAATGAGGTTCAAGTTTCGCCTTCTATGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((((((.....)))))) (((((((.....))))))
DS0724	GCGGATCCAGACTGGTGTTCCTTCCTTTCTCAGACGAGGGAATACATCCGCCCCTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((..... (((.....))) . (((((((.....)))))))))))))) (((.....))) .
DS0725	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAGAGTTGAAGTCACGGGATTCTAACGCGATTCTAAGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((. (((((((.....)))))) .))) (((((((.....)))))) (((((((.....)))))) .
DS0726	GCGGATCCAGACTGGTGTTCATGCCCGTTAAGGAGTGGGGCCACACTATACTCCCTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((((((.....)))))) (((.....))) .

8. APÉNDICES

DS0727	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGTGCCGGGCCGTTTGTGTGCACTATTTTTCATTTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0728	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTTAGTTTTCATTTCTGTATTACCCAGTGCCCGGTTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....)))
DS0729	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGATTATTTAAGTTTTCCTGCCGTTGCGATGTGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0730	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGCTTCTAACCCTTGATGTACTTTTTGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....((((.....)))).....
DS0731	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTTTCCGCGCCCGGATGCTGGTGATATCTGTATGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....(((.....))).....))).....(((.....(((.....)))))).....(((.....)))
DS0801	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTGTGGCTCCCGCGTCGCAATTGCAATTTAAACATTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0802	GCGGATCCAGACTGGTGTGCAGCCATTGACTTCTTCATCAGCACCGGCCGTTTAGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....((((.....)))).....
DS0803	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGAGAGACCTCATGATTTCCACTACTGAACAACATCTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0804	GCGGATCCAGACTGGTGTAGACCGTAGCAAAGAATGATTATGTACGCTACATTTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....)))).....(((.....)))
DS0805	GCGGATCCAGACTGGTGTCCGACGGGAAGTGGTTATACCTCTCCTTACAAGACCTGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....((((.....)))).....
DS0806	GCGGATCCAGACTGGTGTGACTACTACTATATTACGGGTCTTATTCTTCACAGTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((.....((((.....)))))).....))).....(((.....)))
DS0807	GCGGATCCAGACTGGTGTACAAAGAACTAAGCCCGTAAGTTCGGTCTTCTATCCCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0808	GCGGATCCAGACTGGTGTATTGCTTTTGTATGTACAGAAGCGTAGTTCATATCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....((((.....)))
DS0809	GCGGATCCAGACTGGTGTATGAAATCAGATGACCTTATGTTTACCTCTTCGGTTATGCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0810	GCGGATCCAGACTGGTGTCCGCCCCGTTGGTTTTTTTCAGTTACATTTCACTATGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....(((.....)))
DS0811	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCGCCGAATGTGCGCTAATTATTAGTCTCGGTGTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....))).....((((.....)))
DS0812	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGGTCACTATGTCTCTGATTCTCTCCATGCCACACAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0813	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGTGGAGTTATATGATTGAATCGCTCTGCTACCCTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....)))).....
DS0814	GCGGATCCAGACTGGTGTGATCAGAAGTCTTTATATACTTAACCTTGAATCATTGTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((((((.....)))))).....
DS0815	GCGGATCCAGACTGGTGTGGATGGTACTATTTTGTGACATGTTTGTCTTCTATCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....((((.....))).....(((.....)))
DS0816	GCGGATCCAGACTGGTGTGGACACCTTTTTTACGTGATCACGACGGGTCTATTCTGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....))).....((((.....)))).....
DS0817	GCGGATCCAGACTGGTGTATACTGGGCATGCAGGCATGTTGGTGTCTCTGTATGTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....))).....((((.....)))

DS0818	GCGGATCCAGACTGGTGTATCCTTCCACAAGCCATTTTGTGACCCGCGTGTCTCCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((((((...)))...)))...((((.....))).....(((.....))))... GCGGATCCAGACTGGTGTGTGCTGCTGCCCCGTACGCGTATTAGATCTACAATGCCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((...)))...((...)).((...)).....((((.....))).
DS0819	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGTTTTTCATGGCCCTATCTATTCAATCACTTTTTACGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....))).
DS0820	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGTTTTTCATGGCCCTATCTATTCAATCACTTTTTACGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....))).
DS0821	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCATGCCGATATAGCCCATCTGTTCTCTATTTCCTTAGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC ..((((.....))).....((((.....)))).....(((.....))).
DS0822	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCCATGTTTCTACCTGCACACGTACCCCTTCTACCGGGCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).
DS0823	GCGGATCCAGACTGGTGTAGCCGGAGAGTCACTTGTATATAACTTACTATGTCCATCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).
DS0824	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGTGCTGCTTACTTTTTTCGTATTGCTGCGTTCGCTTCTGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....((.....((.....)))...)).....))).....((((.....))).
DS0825	GCGGATCCAGACTGGTGTATAAATATTTGTGGAAGTAATCCCATGGGGTTTTTCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....))).....(((.....))).....((((.....))).
DS0826	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATTCCTTCATATAACTTCTAGTAAGATACGCCTTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....(((.....((((.....)))).....)))).....))).....((((.....))).
DS0827	GCGGATCCAGACTGGTGTACGTATATAGTAGATTTTTTTTTCTCTCTACTAACCACGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).
DS0828	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAGTTCGTGTGGCCTTTGATCACCTATTAGCTCTGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).
DS0829	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCAGTGTGGTTCAACTAATAAATGATGTACCCCATGTGTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC ...(((.....((((.....)))).....))).....((((.....))).....((((.....))).
DS0830	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTACCCATGCTGCCTGTGAGTTCAATTTTTATTATCTAGTGCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).
DS0831	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTGAATGTGTGCATGCCTATTTCACAATTGCTCCATTACGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).
DS0832	GCGGATCCAGACTGGTGTTCACAGCCCTGCTACGGGTTTTATGCGTGTACTTTTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....))).....(((.....))).....((((.....)))).....

352

8. APÉNDICES

RS0105	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCUGUCCCGUCAGCUCUCUGUGCGCGUACGGUUGGGUAUGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((.....))))...)).(((....(((.....)))).....))....))....))..
RS0106	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUCUCCAGAAUAAUACAAGGUUAUUAUUCUAUGCAGUGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....(((.....)))).....)).(((....(((.....))))....)).....))....
RS0107	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGGGGCGCGGGGACUUGUCUGGUUGCUUUUAUGCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....))))....))(((....(((.....)))).....)).....)).....))....
RS0108	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCUGCCGGCUGCCCCGGGUGUGGUUAUUGCAACAGUCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((((((.....))))....))....).(((....(((.....))))....))....))....))....
RS0109	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGCGUACCUACAUAUGAGUGGUUGUGAUGUGUCCUUUGCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....(((.....)))).....)).....)).....)).....))....))....))....
RS0110	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUGUCAGAUAGAAUUCGUCUCCGCCACCGCCGUCUGUGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(....(((....(((.....))))....))....))....))....))....))....))....
RS0111	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCGGGACCAGUCGUGGGCCUGCGCUACAUAUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(....(((.....))))....(((((.....))))....))....))....))....
RS0112	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUUAUACCAUCGUUUCUAUUUCUGUGUAACGGGUGUCCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((....(((.....))))....))....))....))....((.....))....))....
RS0113	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUUAAGCCUAUGAAUUCUUCGUGGCUACUAUAGUCCUGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....))))....((....(((.....))))....))....))....))....
RS0114	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCCGCCGUGUUAUCCACGGAUAUCUUGCCGACUGCCGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....(((.....))....((....(((.....)))).....)).....)).....))....))....
RS0115	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUCGCCGGUCAGUAAGGUUACUUCGACCGUUGCUUUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((((....(((.....))))....))....))....(((((.....))))....))....
RS0116	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUAGGUCGUAUUCUAGAUAGUCUACUAGACUGUGUUUAGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((....(((.....))))....))....))....).(((.....))....))....
RS0117	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAACGCACUCUUGUUGAAGCAAUAGCGUUCGGGUUUGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((....(((.....))))....((....(((.....))))....))....))....))....
RS0118	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUUGCCGAUUCUUGGACGCUAGGCGCACAUUGUGUUGUGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....))))....))....))....).(((....(((.....))))....))....
RS0119	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCUGUUAUUGUUCGAAGCUGGUUAAACGCACUCUUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((((((.....))))....))....(((((.....))))....(((((.....))))....))....
RS0120	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUCCAGCUCGUUCUCUUCUUCUUGCCGACGCCGUUUCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((((....(((.....))))....))....(((((.....))))....))....))....
RS0121	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAUAUACCGGCGGAUCAGGCAUGCUUGAUUGUGUUCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....(((.....))))....))....).(((....(((.....))))....))....))....
RS0122	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAUAGUUGUGGUUCCGUGUCUUGGGAAGUUAACCCUAGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((....(((.....))))....))....))....).(((....(((.....))))....))....
RS0123	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGCGUGGCGCGGAUAUAGACCGUCUUGUAACGAUGUUAAGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....))))....).(((....(((.....))))....))....))....
RS0124	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUGCUGGGCGCGUUAUAGGUUUCGUUAUAUCCGUGCAGUCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((((((.....))))....(((((.....))))....))....))....(((((.....))))....
RS0125	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCGGUCAGUCCUGUCCCCCUCUCUCCCAUUUCUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((((....(((.....))))....))....((.....))....))....
RS0126	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGCGGAUCAUCCUGCCGUUAUUUCCGUUUGAGACCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....(((.....))))....((....(((.....))))....))....))....

RS0127	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGCAAAAUGUUUAAGUUGCGAGUCGUCGACUGUCGUAGGGGCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....(((.....)))..)))))).....((((.....)))..)))..)
RS0128	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAUGAGUUUGGUCACCUCGGGCCGUCGUAUCCUGCCUAUGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((((.....)))..)))).....((((.....)))..)))..)
RS0129	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGGGUCCUCGCUCUGAAGCGCUCUGAUCUUUAAUUGCUGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....)))..)))..)((.....(((.....)))..)))..)
RS0130	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAUCCUACGCUCGCGUAUAACUGAGGUGUGCGUCUUGCAGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....(((.....)))..))))..)))..)).....)
RS0131	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCUACCAGCAUGGCUCGAUUUCUUGUGGUCGCGUACCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....(((.....)))..)))..)).....((((.....)))..)))..)
RS0201	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAUGUGUCGCCGGUAGCGUUAACCGUCAUAUGUCCUACGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))..)((.....(((.....)))..)))..)
RS0202	GCGGAUCCAGACUGGUGUGACUUACAAGUCAAGCUCCUAUUUCGUGUAGUGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..((.....(((.....)))..)))..)
RS0203	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUGAGUUUAGAGCGGGCCGAGAUUUCGACUGCGCGGUGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....(((.....)))..)))..)((.....(((.....)))..)))..)
RS0204	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCUAUAUCUUCUUAGGUUAUAGAGACUUUAAUUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....(((.....)))..)))..)).....)
RS0205	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUCCAGCUAUGCUUUUCCCCGGGAUUGAGGUCUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....((((.....(((.....)))..)))..)))..)).....)
RS0206	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGAGCUAUCCUCUGCGGCAUGGUUCUAUAUGGAUUUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....(((.....(((.....)))..))))..))))..)
RS0207	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUUUCUGUUCUAGCGCGGUAUGUUGUUAACUUUACCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....)))..)))..)((.....(((.....)))..)))..)
RS0208	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGUACACUGUCGUUGGCUUAUCUAAUUCGUGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..)))..((((.....(((.....)))..))))..)
RS0209	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGACCGGUCGACUAUCAUAUGGUUAUGUCCUCCUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....)))..))))..)((.....(((.....)))..)))..)
RS0210	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUGCAGCACUCACUUAUGUCUACCAAUAGUCACUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....)))..)))..((((.....(((.....)))..)))..)
RS0211	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGCACGUUUCUGGCUCUGCCGAGUCGGGUUAAAGUCGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....(((.....)))..))))..)))..((((.....)))..)).....)
RS0212	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCCUGCAGUCUCCGAUCCGUCGGGGAUAAGUGGUUGUGUAGCCCUAAAGACAAGCUUC(((.....(((.....)))..))..((.....(((.....)))..)))..)
RS0213	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGUCCGGUGUAUUUUGAUGGAUGUUCGACUGGUCUCCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....(((.....)))..))))..))..)).....)
RS0214	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAUUGGGCCUGGGCAAGGUCGCGUUUAUUGCUUGCUUUGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....)))..))..((((.....(((.....)))..)))..)
RS0215	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCAGCUAAUUAACUGGGUCCCCUGCGUGGAGUUGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((((.....)))..((.....(((.....(((.....)))..)))..)).....)
RS0216	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUGGGUGUAUAUUUGAGGACUGAGGUUUUUUGUUGCUGCGCCCUAAAGACAAGCUUC((.....(((.....(((.....(((.....)))..)))..)))..))..))..)
RS0217	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGGCUUCUAGAGAAUUUUUCGUUGGCGACCGCUCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....(((.....(((.....)))..))))..)))..)

8. APÉNDICES

RS0218	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCCAUGUCGGGCGUCGUGUAGCUGUUUUCUCUUGUUCGCCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....((((.....)))..)).((((.....)))).....)))).....
RS0219	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUGGCCGGCGUCUUGCGGUGGGAUUCUGUUGCGUGCUUAGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....((((.....))))))..(((.....)))..(((.....)))..
RS0220	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUCUGGCCGGUCCUGGGUAGAACACGUAUGCUACUGUGCCGCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((((.....)).((((.....((((.....)))).....)))).....)))..))... GCGGAUCCAGACUGGUGUCGUCAGCGUCAAUUUUCUCACUCUUAUUGUUUGCUGCGGUGGCCUAAAGACAAGCUUC (((.....((((.....)).((((.....((((.....)))).....)))).....)))..))... GCGGAUCCAGACUGGUGUGUGUGAUGCAUCGGUCCUCCUUGCGCCAUAUCUGUUGUGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....((((.....))))))..))..(((.....)))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUUGCAGUUCUGGCCUCUGCCGAGUCGGGUAUAGUGCGGGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....)).((((.....)))).....)))).....(((.....)))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUCAAUCCAGGGUCCUGCAGGCCACGUUAUUGUGUCCGUGGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....((((.....)).((((.....((((.....)))).....)))).....)))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUAUUUAGGGGAAAGUUUUGACGCUCGCCGAGUCACGAGCCGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....((((.....)))).....)))).....)))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGUGGCCUUAUUUUUGGUACAUAUCCAGCUGUGUUUGUGGCCUAAAGACAAGCUUC((((.....((((.....)))).....)))..(((.....)))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUAAAGUGCUCAGCGGUUAUCUAAGCUUGGAGCCACACGUCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....)).....((((.....)))).....)))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGUAUUUAGCCGUGGGAGCAACUAACAAGCGGUCCGUGUGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....)).....((((.....)))).....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUUGCACCUGCUGGUUCUGUGUCUUAUUAUUGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....((((.....)))).....)))).....))..(((.....((((.....)))).....)))... GCGGAUCCAGACUGGUGUAUGUUAUAUUUAUUGGGUGGAUCGGUCCACCCUCUCUGUGGCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((((.....)).((((.....)))).....)))((.....((((.....)))).....))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGCUUGCUGUUCUUUAGGCUUUUAUGAACGUUAUGUGGGCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))..(((.....((((.....((((.....)))).....)))).....))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGACAUUAGCUUGAUUCGCGAUUCGGUGCCUUAACACGUGGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....)))).....)))).....(((.....)))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUUGACGAGAUGUGUGAUUCUACUUGCUGUUUGUAUACUUUGGCCUAAAGACAAGCUUC ..((((.....((((.....)).((((.....)))).....)))).....(((.....((((.....)))).....)))... GCGGAUCCAGACUGGUGUUGGUUGUGUCUACCUACGCGCGGAUCGCGAAUCACUGUCGCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((((.....((((.....((((.....)))).....)))).....))..(((.....)))..))... GCGGAUCCAGACUGGUGUUCAGCUAGCCAGAAGGUCUUGGCCGCAUGGUGUCUGUGGCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((((.....)))).....(((.....((((.....((((.....)))).....)))).....))... GCGGAUCCAGACUGGUGUCUGUGCAGGCCCGGUUGGAAAGAAUAUUAACUCCGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....((((.....)))).....)))).....))..(((.....)))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGGAAUGCUGCUUUUCUCUUUAACGUCGCUACGAUUGCUGUGGCCUAAAGACAAGCUUC (((.....((((.....)))).....)).((((.....((((.....((((.....)))).....)))).....)))... GCGGAUCCAGACUGGUGUCUAGAUCGGCUUGCCUUGCUCUUAACUCCGUCACCCGCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((((.....)))).....)).....(((.....((((.....((((.....)))).....)))).....))... GCGGAUCCAGACUGGUGUAUACUACUAAUUGCCGUUCUCGAGUUUGCAGUCUCCGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....((((.....)))).....)))).....))).....
RS0221	
RS0222	
RS0223	
RS0224	
RS0225	
RS0226	
RS0227	
RS0228	
RS0229	
RS0230	
RS0231	
RS0301	
RS0302	
RS0303	
RS0304	
RS0305	
RS0306	
RS0307	
RS0308	

RS0309	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUGUCGUCUCCGUCCAAAACCUUAUACUCAUACCUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.(.(((.(.(...).)))))..))).....(((.....)))....
RS0310	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUGUUAUCUCAUUCUUCGCGCGUCGCAUAAUUGCUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((....(.(((.....))))).)))))..((((.....))))).
RS0311	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGCAGCCUUAUCUCGCUUUAUUCGGUUCUUUGCGUGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(.(((.(.(((.....))).....(((.....))).....)).))..)).....
RS0312	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGCAAGAUCCCGAAACAAGAUCAACUAGUGUUUCCGACGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.(.(((((.....).(((.....))))).))))).))))).....
RS0313	GCGGAUCCAGACUGGUGUGACGAUGGCUCCGUAGUCGGCUUUGCCCCUCAUCCUCCCCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((.(.(((((.....))))).))..).)).....))).....
RS0314	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGCUCACUACUUGACCGUGAUCUUUUUGUGCUGUGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.(.((.(.(((.....))))).))))).....(((.....(((.....)))..)).))....
RS0315	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGCGCCUGUCGGGGUGUUAUUUAUUCUUGCGAUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.....)))..).(((((.(.(((.....))))).))))).)))))..). ...
RS0316	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGCGGCUCACACUCCAGUCCGUUUUCUUCUGUCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(.((((.(.(((((.....))))).))))).....).)))))..)).....
RS0317	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUUCUUAAGCAUUAUUAUUGGCACGUGUUGCUAGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.((((.(.((((.....))))).)).....)))..))(((.(.....)))..)).....
RS0318	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCGUCACGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.(.(((((.....).))..).)).....((.....(((.....))))))).....). ...
RS0319	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCGUCACGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.(.(((((.....).))..).)).....((.....(((.....))))))).....). ...
RS0320	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCGUCACGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.(.(((((.....).))..).)).....((.....(((.....))))))).....). ...
RS0321	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUUGGUAUCCGCCACCGGGUGGCGCUCUUGUGGCUUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((((((.....))))).))))).....((((((((.....))))).))))).....
RS0322	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUCUUAUGAAUAAUUUAUGGAUGUUGUGCUAUUGAUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(.((...((.(.((((.(.(((.....))))).))..).))..)).....)).)).....
RS0323	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCGUCACGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.(.(((((.....).))..).)).....((.....(((.....))))))).....). ...
RS0324	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUCUUAUGAAUAAUUUAUGGAUGUUGUGCUAUUGAUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(.((...((.(.((((.(.(((.....))))).))..).))..)).....)).)).....
RS0325	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCGUCACGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.(.(((((.....).))..).)).....((.....(((.....))))))).....). ...
RS0326	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUCUUGUGUGUUCGUGGGUUAUCUCGAGCGGUGUAUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....(.....))..(((((((((((.....(((.(.((.....).)))))..))))).))))).....)))))....
RS0327	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUGUCAUAUAGAGCGGCGUGUGUGCUAAAUUCGUCACGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.(.(((((.....).))..).)).....((.....(((.....))))))).....). ...
RS0328	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUCUUAUGAAUAAUUUAUGGAUGUUGUGCUAUUGAUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(.((...((.(.((((.(.(((.....))))).))..).))..)).....)).)).....
RS0329	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUACUGAGUAUUCUCCAGUGUACCCCCUCUAUUUCUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((.(.((.(.((((.....))))).))..).))..))..(((.....)))..). ...
RS0330	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUACUGAGUAUUCUCCAGUGUACCCCCUCUAUUUCUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((.(.((.(.((((.....))))).))..).))..))..(((.....)))..). ...

[illegible]

8. APÉNDICES

RS0417	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUGUCCUAUAUGACGAAACGCUCCAUCCUACGUGGUACGGCCCUAAAGACAAGCUUC .. ((. ((. (((((((((.....)))..)))))) (((.....))) ..))
RS0418	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCAUGUAAGAUAGGUUUCCAAGUUGCUGUCCGUCUCCCGGCCCUAAAGACAAGCUUC .. (((.... (((. ((. ((. (((. ((. ((.))..)) ..)))) ..)))) ..))
RS0419	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCACGUAAGUUAUGGUCGAUUGGGCAUUCUUCUUCUUGCGCCCUAAAGACAAGCUUC .. (((((((.....))..)))) ((. ((. (((((((.....)))) ..))) ..)) ...
RS0420	GCGGAUCCAGACUGGUGUACCGCCGUAAGGCCAGGUAGGCAUCCUCGGGUUUUUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((((((.....))..))..)) ..) (((((((.....)))) ..) ..) (((((((.....)))) ..) ..)
RS0421	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAACAAAGCCUAUGUCAUGCUUCCCCUCUGUUGCCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC .. ((. ((.))..)) ..) (((. (((. (((.)))) ..) ..) ..)) ..) ..
RS0422	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAGUAUCCCUUUGUUGGGUCUGUUUCUGCGGACGUGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((((. (((((((..... ((.....))) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0423	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCGCGAGUCUGUACCUUUUUUCCAGCCAGGAGCUUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((((.))..)) ..) (((. (((. (((.)))) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0424	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGUGUCCUGAGUCGUCAACAGGUGUGGUUUGUCCACUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((. ((. (((.)))) ..) (((. (((. (((.)))) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0425	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGGUGCACCAUAAUGGUUUUCGGUCCGGUUGCCGUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC .. ((((((. (((((((.....)))) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0426	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUACCGUUAACUUGGGUGAUCUAACAGUGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC .. ((. ((. (((. (((.)))) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0427	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUAAGGUGAUGAUUCUGUAUAUACUACUGUUGCGCCCCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((... ((. ((. (((((((((((((.))..)) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0428	GCGGAUCCAGACUGGUGUCACAUGUUCUUAAGGUCUGUAUGGACCUGGUGGAAGUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((... ((. ((. (((((((((((((((((((((((.....)))) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0429	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGGUGUCUUAUCUGGUGACGAUAUCAUUCUCCGUCUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((((((((. (((((((((. ((.))..)) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0430	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAUUUAGCUCUAGGUUGUUAUAUGUGGCUAACUGCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC .. ((. ((. (((. ((.))..)) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0431	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAGUCUCCCCAACUAGUAUCUAUUGCAAGUUAACGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.... ((.)) ..) ((. ((. (((. (((.)))) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0501	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCAGUCCUCUGAAUCAGCGGUGAGGCAGGUUGCUUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((. (((. ((.))..)) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0502	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGUUCUUUUCAGUGCUGUCAAGUUCUCGCGUUUGCUUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((((. (((((((.....)))) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0503	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUUAACAUGGCAUUAUUUCGUUGGAGUUAUCUUGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC .. ((. ((. (((. (((((((.....)))) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0504	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUUGAUCUUCUAAGUCGCCCCCUCGCCAUAAACCCUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((..... ((.....)) ..) ..) (((.)) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0505	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUUGAUCUUCUAAGUCGCCCCCUCGCCAUAAACCCUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((..... ((.....)) ..) ..) (((.)) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0506	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGAGACGCUAAAAUCGUAAUUGUCCCCUGCGUGCCGUCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((((((. (((.)) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..
RS0507	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUUAGUCGCGUUAUUUUUGUUCUAGUGUUGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((..... ((.....)) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..) ..

[illegible]

[illegible]

8. APÉNDICES

RS0620	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUGGCAUAGACCUGGUAUCCGCGGAACUGUGUAACCCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))((...(((...)))...))...))
RS0621	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUAUGUUCUUCGGGCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))(((...(((...(((...)))...))...)))...))
RS0622	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAAUCUAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...(((...(((...(((...)))...))...)))...))...))...))
RS0623	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUAUCAAUGAAAAAAUUCAGUAGGGUCUCUCGCGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...(((...)))...))...))...(((...)))...(((...(((...)))...)))...))
RS0624	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUGGCAUAGACCUGGUAUCCGCGGAACUGUGUAACCCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))((...(((...)))...))...))
RS0625	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUAUGUUCUUCGGGCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))(((...(((...(((...)))...))...)))...))
RS0626	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUUGACCCCCGCGUCUAGGUCGCCCCUAUAUGUUCUUCGGGCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))(((...(((...(((...)))...))...)))...))
RS0627	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUGGCAUAGACCUGGUAUCCGCGGAACUGUGUAACCCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))((...(((...)))...))...))
RS0628	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUGGCAUAGACCUGGUAUCCGCGGAACUGUGUAACCCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))((...(((...)))...))...))
RS0629	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUGGCAUAGACCUGGUAUCCGCGGAACUGUGUAACCCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))((...(((...)))...))...))
RS0630	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCCCGAUCUUAUCUUGUAACCGGUUUCUGGACAUCUGGGGCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((...(((...(((...(((...)))...))...)))...)))...))
RS0631	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUGAGGGACUUUAAACACUUAUUCUUCAGUCCUACCGAGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(((...(((...(((...(((...)))...))...)))...))...))(((...)))
RS0632	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUGGCAUAGACCUGGUAUCCGCGGAACUGUGUAACCCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))((...(((...)))...))...))
RS0633	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUACUCAAUUGAGGGUCGGGUGGUCUUGUUCUCCGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...(((...)))...))...))...(((...(((...)))...)))...))
RS0634	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUAUCAAUGAAAAAAUUCAGUAGGGUCUCUCGCGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...(((...)))...))...))...(((...)))...(((...(((...)))...)))...))
RS0635	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAAUCUAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...(((...(((...(((...)))...))...)))...))...))...))
RS0636	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUGUUUAGACCGCUUGUCCAGGUACGCGUCUGCGGGGCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...)))...))...(((...(((...)))...)))...))
RS0637	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUUCUAGGUUAGGAUCCGUCCUUUUUAAUUAUUCUGGGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(((...(((...(((...)))...))...)))...(((...)))
RS0638	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGACGUGUAUAGUGGCUCUGAGUAUGAACUUCUCUGGGGCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...)))...))...(((...(((...)))...)))...))
RS0639	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAAUCUAAUUGCUUCAAAAAAGCAGACCCUACGCGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...(((...(((...(((...)))...))...)))...))...))...))
RS0640	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUGUAGAGUAACUGCCAGUGGUUGUGUUGUGUGGGGCCUAAAGACAAGCUUC ...(((...(((...(((...)))...)))...))...(((...)))
RS0641	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUUCUAGGUUAGGCUCCGUCCUUUCUAAUUAUUCUGGGGCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))...)))...(((...)))

8. APÉNDICES

RS0701	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAUUGCGCCACUGCGCCUGGAUUUUGUAAUUAUUUGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))..(((.....(((.....))).....))).....))....
RS0702	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAGUUCUGCAAUUAUGGACGUAGCGUUGAUUCCCGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....))).....))).....((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....
RS0703	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCGCCUUGUCUUCUGGGGUCAUUGAAGAGUCGUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....))).....)))((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0704	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCGCCUUGGCUUCUGGGGUCAUUGAAGACCGAAUUGGCCCUAAUGACAAGCUUC ((((.....(((.....))).....))).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0705	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUACCGUGGGCGCUUUGCGGGAUUGAUGAGUUUAUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....)).....
RS0706	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCGUCGGUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....))).....))).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0707	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCGUCGGUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....))).....))).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0708	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCGGAUUAUGGGCUCGCUUCGGUUGGCUUUGUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0709	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAGUUCUGCAAUUAUGGACGUAGCGUUGAUUCCCGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....))).....))).....((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....
RS0710	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAAACUGAUCUACGAUUUGGGGGUGGCGUCGGUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....))).....))).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0711	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCAUCCAGACAGUCUCUAUGAUGCUCAAUAAUCUGGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....)).....
RS0712	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCGCCUUGUCUUCUGGGGUCAUUGAAGAGUCGUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....))).....)))((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0713	GCGGAUCCAGACUGGUGGCCAUUAUAGGAGGUCGUGAUCACAACCGUUUACAUUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....))).....))).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0714	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAUUGUUAAGGUGAUUGUCCGUUAGCCUGUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0715	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAUUGUUAAGGUGAUUGUCCGUUAGCCUGUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0716	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGAAUGUGUCGUUGUUUGACUUUCAGCAGUACCCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....)).....
RS0717	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGAAUGUGUCGUUGUUUGACUUUCAGCAGUACCCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....)).....
RS0718	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAUUGUUAAGGUGAUUGUCCGUUAGCCUGUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0719	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGACUAAAAAGAUUGCGUAACACCGUCCCUUUAUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....)).....
RS0720	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUCCUGUGUAUUGGUUAAGGGUCUCCUGUCUUCAGUCUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0721	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGAUUUUGACAUUGCGAGAGUUGUGUGUCUACCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....))).....))).....((((.....(((.....(((.....))).....))).....))).....
RS0722	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGAUUAGCAUUGCGAGUUGUCUAGAUUCGGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....(((.....(((.....))).....))).....)).....)).....

[illegible]

8. APÉNDICES

RS0815	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAGUUGUUUUUUCGUGUGUGCUAGGCCACAUCUCUCCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))).....)).(((((.....)))).....)).)... GCGGAUCCAGACUGGUGUUUACCGUGAAAGUCGCUUAGUUAUUAGUUCGCGUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))).....)).(((.....(((.....)))).....)).)... GCGGAUCCAGACUGGUGUUUCCUGUGUUUAGCGUUGGUGUGUUCCUCCGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....(((.....)))).....)).)... GCGGAUCCAGACUGGUGUAAACAGCUUCCCGCUUCGUAUUCAGAGUAUUUCAGUUCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....(((.....)))).....)).)... GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUUCUGUUUUUAUCUGGUUUCAGAUUAUUUGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....(((.....)))).....)).(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGCAUAAUUGGUUUAUCUGUGGCGUAGCUAGGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....(((.....)))).....)).)... GCGGAUCCAGACUGGUGUGCUUAAUUCUAUGUACGUCUUAUCAGAGUGGUCUUUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUUUACCGUGAAAGUCGCUUAGUUAUUAGUUCGCGUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))).....)).(((.....(((.....)))).....)).)... GCGGAUCCAGACUGGUGUUUAUGUAUAAAGCAUCUGUCUCACUCGUAGGCUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUAGUGAAGAAAAAAUUGGCGUUGAUUCCUCUGCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))).....)).(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUUGAAUAAUUGGUUUGUUCUGAUUGCUCUCCUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUGUUCGACGGUGAUUUGGAAUUUUUGACUUCUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCCCGUGUAGCUUAAACGUUUUUGUUUCAUACGGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGCAAGUUCUUUUAAACAAUCGUAAUUGGUGCACCACCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUCCAUUGGUUAAAAUUGAUUUGAUUCCUCUGGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGCAAGUUCUUUUAAACAAUCGUAAUUGGUGCACCACCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGGAGCGACGGCAGUCAAUGACUGUUCUGUGUAUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....))))..... GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGGAGCGACGGCAGUCAAUGACUGUUCUGUGUAUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....)))).....
RS0816	
RS0817	
RS0818	
RS0819	
RS0820	
RS0821	
RS0822	
RS0823	
RS0824	
RS0825	
RS0826	
RS0827	
RS0828	
RS0829	
RS0830	
RS0831	
RS0832	

8. APÉNDICES

Nombre	Secuencia 5'-3'
DE0101	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCGATATATGGGTAAATTTTCTCTGTCATATCCAGTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....((((.....)))))))))).....((((.....))).
DE0102	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGTCTGACGTCCTTAGTACATCATTTGTACATTACCTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))..((((.....)))..((((.....)))).....((((.....)))).....
DE0103	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTAGCCAGCAGGTCCGCGCGTTCCTTATTTTAATCTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((((.....((((.....))))..)))))).....((((.....)))).....
DE0104	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCGTATGTACATGGCAGAATCTTCACCTTCTCCTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....((((.....))).....((((.....)))).....
DE0105	GCGGATCCAGACTGGTGTACTGATTATCGCATGTTCTGCTCGCGCAATACCAGATGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....((((.....((((.....))))..)))))).....((((.....))).
DE0106	GCGGATCCAGACTGGTGTGAATATAAGTGACGGTATAGACTCTGGTGTACCCTTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).
DE0107	GCGGATCCAGACTGGTGTGATGTCTTAGAGCCGACCTTGGGGCGACACACTCTCCCGCCCTAAAGACAAGCTTC .((((.....)))).....((((.....)))).....((((.....))).
DE0108	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATCCTCGGTAGGCTGATTGAGGCTCGCCTTGTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))..((((.....)))).....
DE0109	GCGGATCCAGACTGGTGTCTGTTGGGCAATTATACTCTTTCGGGTTGCAGCATAATCCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))))..((((.....((((.....))))..)))).....((((.....))).
DE0110	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGGTACCTAGTGACTACGGGGTACTGATTCTAGACCCTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).
DE0111	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCAGGGACTGTGAAGGAGCCTCCTGTCCAGTATAGCGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))..((((.....))).....((((.....))))..
DE0112	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCATTTATTTTAAATTTTTTTTACGGTTCAGTCCCTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((.....((((.....))))..)))).....((((.....))).
DE0113	GCGGATCCAGACTGGTGTCCAGCTGCTCGTAAACGGTGAAGTTAAGGTACGGTCGTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....))).....((((.....)))).....
DE0114	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGAAGTTTCTTGCCACTTGGAACGGGCGCAGGTTGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....))))(((((.....))))..((((.....))).
DE0115	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTTTTCGCAATGAGCAGCCTGCGTCGGACAAACCAGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....((((.....)))).....)))).....((((.....))).
DE0116	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTTAGGCGAGGGCTGCTTCACATGCTCTTTTATACTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....((((.....))))..))))(((((.....)))).....
DE0117	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCTGCTTGTGATGCGATGAGTAAGATCGTATCTGTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC .((((.....((((.....))))..)))).....((((.....))).....((((.....))).
DE0118	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCAGCGGGTTGTCGACCATTTCGATTACATTGTTCTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....))).....((((.....))))..
DE0119	GCGGATCCAGACTGGTGTCTTTTCACACGTGGTCTCCGCTGGTTGCTCCGAGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....)))(((((.....)))).....((((.....))).
DE0120	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGTGTTTGTGCGGACTATCTATACTCGCTCCGATTTCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....((((.....))).

8. APÉNDICES

DE0121	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCATCCTGCTGGCGTTGTCCCTGCCACGCTGCTGTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0122	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTGGCCCATTCGTTGCAACCAGTGACGCAACATTCCGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC ..((..(((.....))..))..)).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0123	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAAAGAGACACGGCGACGTCGTTTACTTCCTTCCTCTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0124	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTCTGCTTTAACCTTGGCTATTTCCGGTGTGGCACTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0125	GCGGATCCAGACTGGTGTGATGATAAGCATGGGTGACCTGGCAAACGCTTCCTGAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0126	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCTTGCTCAAACGCTGCTTGAAGCCGCTGCCATTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0127	GCGGATCCAGACTGGTGTGAAGTTATAAGATTGCTATATTCGTCGCAGTTTCCGGAGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((.....))).....(((.....)))..
DE0128	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGGGACGTCACCTATGATCCGCCCAGGTGCCTTTCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((.....))).....(((.....)))..
DE0129	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGCACACTAGTGCAGTAAGTGTGAGGCCAGATCCCTTGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....))).....(((.....)))..
DE0130	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCGTGTTAATCGCGCTTACACTAGACCTTTTCATCAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....)))..
DE0201	GCGGATCCAGACTGGTGTGATGGTGAAGACCCCTATTGGTGGCCTTCGAGGATATCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0202	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCTTCAGGAGTCTGGCAGGCGCTTTACTCCGGGGTACGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0203	GCGGATCCAGACTGGTGTGACGTTACTTTTGTGTGTTAGCATTGGGAATAGTTCTGAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0204	GCGGATCCAGACTGGTGTATATACGTGCGGTGTGAGTAGGGTTCTCATTTCTGTCGTTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0205	GCGGATCCAGACTGGTGTGATAGTTTCGGCTGCTTTTCGGTGTGTTTTATTCTCCTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0206	GCGGATCCAGACTGGTGTTCAGTGCCTGTTCTGGCGCTGTGTAGCCCGTTTGACGCAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0207	GCGGATCCAGACTGGTGTATACTTGCTGGCGGTGAAAATAGCTTATTTCTGAATTGGAGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....)))..
DE0208	GCGGATCCAGACTGGTGTGACCGTTTATTGGCATATCACTGAAAGTCTCTGCATTACGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0209	GCGGATCCAGACTGGTGTAGCCGTAAGTCATGTCAGTCTTCTGTATGTATTACGCGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0210	GCGGATCCAGACTGGTGTACCCGGCGCGGGGAAGTCCACGGTGCATTTAATGGCGCGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0211	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCTTGTGGCTGGTTAATGACTTCTCTTCCTTGAAGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0212	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCGGGTAGGTAACATTTTCGATTTCGGCCCTACCTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....))).....(((.....)))..

8. APÉNDICES

DE0213	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGCGTTTAGGTAAATTCGTGTGATTTTATCGCATTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DE0214	GCGGATCCAGACTGGTGTCCAGAACTTAGTTGATCACTTCCGCGACTCATACCGTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....))).....((.....)).....(((.....)))
DE0215	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAGGTAGTCTTTTACGCTTTCACGTGTGTGGTTTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....(((.....))).....((((.....)))).....
DE0216	GCGGATCCAGACTGGTGTGGAACGTACCGTCGCTTGCAACCTATCATGATCGGGTTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC .(.(((.....)))).....((((.....)))).....((((.....)))).....
DE0217	GCGGATCCAGACTGGTGTCAAGGGGAATGTAACCTCGTCTCCAATGCCGCCGTCGAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)))(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0218	GCGGATCCAGACTGGTGTACGTTGCGGCGCAGTATATCCTTCGGCGTTAGACACTCAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....
DE0219	GCGGATCCAGACTGGTGTACTTTTCTCGCCAGGCTATGGCTGGATCATGGTACCTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC ...(((((((.....)))))).).....)))).....(((.....)))
DE0220	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTTAGGGGCGAGGCTATTATGCTGTTAGATCAAAGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....((((.....)))).....(((.....)))
DE0221	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGTGCACCACTGGTACTCATAATGCAGACGTCCAGGTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0222	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTGTCAATTGAGAGACTTACATGTAGTGCCGTGAACCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....
DE0223	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCGTTCCGAACTCCATGCTTATTCGTTCCCTGCATTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC .(.....)).....((((.....)))).....(((.....)))
DE0224	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAAGGGCCATCATGTATTATGAGTCAATGGTTCCGGTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC .(.....).....)))).....(((.....)))
DE0225	GCGGATCCAGACTGGTGTACCGAACCTTTGTTGATTGTACTCTGGTTCACCTTCGGGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DE0226	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCATGAATAGGCAGGTCACTACGCTTGGGAATTATCAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....
DE0227	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCATTTTAGCGCGTGATCTTGTGTGTTCTGCTCCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....((((.....)))).....
DE0228	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCTCACGGTGGGTGCAGGTAGGCGCTCCGATCGCTGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....((((.....)))).....
DE0229	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGGGTCAGTATTTCCCGGCGCGTTTTTCTCCCGCGCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))
DE0230	GCGGATCCAGACTGGTGTCCGTTGGGTATAGGCGTACGTGCTGATTAGTGTGTTATGCCCTAAAGACAAGCTTC .(.....).....((((.....)))).....(((.....)))
DE0231	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAATTTCTGGAGGCTATGGTTGCTAACCGTACCAGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0232	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATACCTCCAATTCGAGGAAGGCCCTTAGTGATACTTCTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....((((.....)))).....
DE0301	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGAGGCCAGGCGCGTGGTCATATTGGACTTTTTATGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....((((.....)))).....
DE0302	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGGAATATGATTTCTTGTTCGTCGTTTTATTGCCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))

8. APÉNDICES

DE0303	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCCTACGTTTACCCCGACATCATTCACTGTTGCACTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0304	GCGGATCCAGACTGGTGTCTAAGTTCGGCGTATTGATTTTACCCACTCTCTTTCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0305	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGTTGCGTTTGCTTGATTGTACAGTGCATTATTATTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0306	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGCAGAGGTTTCGGCGTCGCCTTGTTATTTGTATTTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0307	GCGGATCCAGACTGGTGTACGGTATATTCCTATTCGCGTAAAGTCCCATGCATGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0308	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTTACCTTCCCTATTGAATAATTTCGCATACACTCTGGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0309	GCGGATCCAGACTGGTGTATGATGTAACCTCTCACTTACCCGGTTATAAATTTCAGTGCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0310	GCGGATCCAGACTGGTGTGTATGTCTATACAGTTCCGAAACATTCAAACCATCCAGTGCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0311	GCGGATCCAGACTGGTGTGACGGTATATGACTCAGTTGACCCGTCCAACCTCCCTGTGCCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0312	GCGGATCCAGACTGGTGTGGAAGACATGTAATTGTAGTGAAAATCTTCATCCGTAATCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0313	GCGGATCCAGACTGGTGTAGCACACGTGCGTTCATGTTCACTAGGTAGGTAGCTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0314	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTAGTCCACGCTTTTTCCTTTTATTCTGCCGTTTCGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0315	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATTAGGGTGCGGGTAGTCTCGCCCTCGTTTGGTCACGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0316	GCGGATCCAGACTGGTGTATGTGCGTAGTACACGGCCAATTGTTCTATCTGTCTATCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0317	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGTGGATGATTGATGGATTGTTGGGTTTCTATATTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0318	GCGGATCCAGACTGGTGTATTTCCTGGGTTCTGCAGGCCTGCTTCTCACCCGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0319	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGGGTAGCCGCTTTCGCCTTCATATTATTCTCCCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0320	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGCTCTGGTCTCTCCGATCCGTTTGTTCCTTCCGATCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0321	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGTTGGGCACAAACGCGGAGATTTGCATCTGTTGTTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0322	GCGGATCCAGACTGGTGTTCCTGGGAGGCTTGTATGTTCTTTTACTGATCGTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0323	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGTGCTGTGGCATTTCGTTTCGCTCACGTTGTTTCCCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..
DE0324	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGTTCTCTTCTGTATACTGTATACGCCCTAGTTGGAACGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....)).....(((.....)).....(((.....)))..

8. APÉNDICES

DE0325	GCGGATCCAGACTGGTGTAAAGTGTTTCAGATGAGTTAATGAGTGCTCACGCTCAGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(.....)).....(((.....))).....(((.....)))
DE0326	GCGGATCCAGACTGGTGTATGAACCTTATGCCTTAACGTAGGCTAATTTGTATCTTTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....)).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....
DE0327	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCAATGCTGCCTTTCTCTGACGTACCCCTTCTTCCGCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0328	GCGGATCCAGACTGGTGTGTATATTTGAAACAGTCGTTGGCTAAATTAATCGCTCTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0329	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCTCTACCGAGCCGGGGCTCGCACACGGTACGTCTACGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0330	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGGGGTGTGTAGACATCAAGGATCTGCCATAGGACGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0401	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCTAATCACACCTTCACTTTGACGATGTTTCGAACGGAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0402	GCGGATCCAGACTGGTGTCTACTTATGCGTGCATTCTAGGATAGTAAGCCCCCCCAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0403	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCGAAGTATTACACTTTGACTATTTACCTGCACTATTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0404	GCGGATCCAGACTGGTGTGGATGCAGAGTTATCAGAATAGGCTTTTGTAGATTATTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0405	GCGGATCCAGACTGGTGTAAACATCTGAATTGTGCGAATCTTCTATGTCCATCCTAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0406	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTGTGCCGCCGAAGGTTTCTCTTTGTACTGTCCCTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0407	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCGAGCTTATTATACCGTTTCGTCAACGTTGAACAGATTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0408	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTGTGCCGCCGAAGGTTTCTCTTTGTACTGTCCCTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0409	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTAATTAGGTTATATTCTGTCAAATACGACACATTAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0410	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGCACTAGGACCCAGCGAGACTCAGTAATTGTTGGTTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0411	GCGGATCCAGACTGGTGTGTACGATATTGGCCGCTTTGCCATCTTTTCGTTCACTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0412	GCGGATCCAGACTGGTGTGGAGATACGTGTCTAATCCATTTGACCCCTATTTTTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0413	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCCATTTATCTTGAATGCCTACGCCTCTTTTAGTTTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0414	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCTGTGAATAAGTTCCCCTGATTGCTCTCTGACCATGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0415	GCGGATCCAGACTGGTGTCCATGGTCACTCTTCGTTTGAAGATTGTAGTTAATGGAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0416	GCGGATCCAGACTGGTGTCCATAGATGCAATTGAACCTATTGGTTGGTGACCCCATTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))

8. APÉNDICES

DE0417	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCGTTGTTCTTGATTATACAAGGCGTTGATATCGCCCTGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0418	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATGTGGTCAGCGTACAGACGAGCGGAAGTAACTTCGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0419	GCGGATCCAGACTGGTGTATCCGAGATGTCGAGTTTCTATATTTAGCCCTAGACTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((((((.....))).....)))).....(((.....)))
DE0420	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCGTTTGTCTTGAGCTTCATTGTGGTTTTTTCTTAGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0421	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGGTGCCAGCTAGGGTAGGTTTTTTTTTCCCTTTTACGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0422	GCGGATCCAGACTGGTGTAAAGGGTTTTTGATTAGTCGGGGCCTGTTCTTTTCGTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0423	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCGTTCCCCCTTTGTTTCTATTAGGACGCGTCCGCTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....
DE0424	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGATCTAGTTTAATCCAGGTGCTGACCATTATCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0425	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAAAATTAAGCGGTGCGCTGTCTCATTGGTTTTGTTCCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0426	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATGTACATTGGTAATTGTGCGTGTGTTGTATTCTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((((((.....)))))).....(((.....)))
DE0427	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTATGCACACGGGACTTATACTGCTCGTTACGCCATTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....)))
DE0428	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTGTATCGTTGGAGATAAGCGCACGTTTCGATTACTACGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0429	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTCTGCAGACTGAGCTTCCGACTTCGTAATTTTACACCGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((.....(((.....)))))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0430	GCGGATCCAGACTGGTGTACGCGTGGCTATTGCTGGCTTCCTGTATTCTCTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....(((.....))).....)))(((((((.....)))))).....(((.....)))
DE0501	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGTTGATACACCTCGTAAATTTACTCTCGCTTCTGCTAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0502	GCGGATCCAGACTGGTGTATTTCGACTTAACATCCTCGCTCTCCTCTTGGTAACCTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....)))
DE0503	GCGGATCCAGACTGGTGTATGTGCGAGTTGTAGCAGCCGCTTGATTACGGTACTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....)))
DE0504	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTAGTGGATGTGCAGGTGATTCGACCAACCTTTTCCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....(((.....)))))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0505	GCGGATCCAGACTGGTGTCTATTTTAGTCTAACTGGATGTTTCGTTATAATGACCTAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....)))
DE0506	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTAGTGGATGTGCAGGTGATTCGACCAACCTTTTCCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....(((.....)))))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0507	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGGTTGATATCTGTTCATGCTTATTTCTACTGGTTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....(((.....)))))).....(((.....)))
DE0508	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCGTTTGTAAATGTATAATAGTTATGTACAGAACGTGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((.....))).....(((.....)))

8. APÉNDICES

DE0509	GCGGATCCAGACTGGTGTATATGTGACCTACCTTGTGAGACGGCCCTTATTCTCTATTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0510	GCGGATCCAGACTGGTGTACAGGTTTCAGGGTCCAGAGATCTGATTTTATACTGAGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0511	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGTTTCAGTTTCCCTTGTGTTACCGTCTCCAGTTAGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0512	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGTTTCAGTTTCCCTTGTGTTACCGTCTCCAGTTAGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0513	GCGGATCCAGACTGGTGTAGACAGGTGCTCATTCCCGCCGGTACTCGGCCATCTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0514	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAAAGTCGGTGCCATACGATTCCCTCATCCGCACGTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((((.....)))))).....)))).....(((.....)))
DE0515	GCGGATCCAGACTGGTGTACAAACAGCAACATAGATTAGTTACTTCTCCCTCCCTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0516	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGCACCTTACCATGCCTCTCTCCCTTGTTAATCCAGAGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0517	GCGGATCCAGACTGGTGTATGTAACCTGGGGTTTGGCTAGATTATTTTGACTCGACGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0518	GCGGATCCAGACTGGTGTATAGGTGACACTACTTATTACCTACCTGTTCCGTCTATAGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((((((.....)))))).....)))).....(((.....)))
DE0519	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTATTCTTGAATTGATTACCCCGATTCTGTATTAAAGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0520	GCGGATCCAGACTGGTGTAGACAGGTGCTCATTCCCGCCGGTACTCGGCCATCTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0521	GCGGATCCAGACTGGTGTCTTTTACTTTTCTATTGTGTCAGATGTATTCTGGCCCGACGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0522	GCGGATCCAGACTGGTGTCTTAGTTTTAACAGATAGTCCCATCCGAGTTTATTGGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC .(((((((.....)))))).....)))).....(((.....)))
DE0523	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAATCGTTGAATGAGGTCGGCACTTTTTTCCGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0524	GCGGATCCAGACTGGTGTTCCTAGTTTAGCGTCGATTGTTACGCCGACGTTTATTATGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0525	GCGGATCCAGACTGGTGTGATTTTTATCTGATTATTTCGAATCTTATGTGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0526	GCGGATCCAGACTGGTGTCTGCTAGTTAATGTTTACCGTTGATTAACCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0527	GCGGATCCAGACTGGTGTGCATATAACGCTAAGGTTTCCAAGTTTACAGTTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0528	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGTCTATGTAGGTGAACCATTCGATTTCATTATGTAGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0529	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCCTGCTCTATAGATTACAGTTCGTGTGTTCTGCCCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0530	GCGGATCCAGACTGGTGTCTTCGATTGGGCATTGGCGTCCTTATATTATCATGTTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))

8. APÉNDICES

DE0531	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGCGGACGGTTCGGACATTACACGCTTATTACATTCATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).((.)).
DE0601	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTGTGCTTTAGTCGATTACTGGTCATGTTGTTAAGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).(((((.))))).((.)).
DE0602	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAGATAGTCTCACTATTACTCCGTGGAGTTGTTTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).((.)).((.)).
DE0603	GCGGATCCAGACTGGTGTGTGTTTCTTTCCTCAATTACGCGCTACATGGTTATGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.((.)).)).).((.)).((.)).
DE0604	GCGGATCCAGACTGGTGTATCTTTCTATACTATTACAGAGTGCTTCCCTTGCCCTCAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).((.)).(((((.))))).((.)).
DE0605	GCGGATCCAGACTGGTGTATTGTGTTCAATCGTTTAAATGAGCGTACGGATCTAGCGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).
DE0606	GCGGATCCAGACTGGTGTCTCAGATAAAAACTCCTTGTGACGCTAATTCTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).(((((.))))).((.)).
DE0607	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTTTTAAATCAGTTGCCCCACTACCGTTGTTCTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).
DE0608	GCGGATCCAGACTGGTGTGAAGGTACAGATCGTACTAATGAGTTATATCGCAGGAACGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).
DE0609	GCGGATCCAGACTGGTGTATGATGAGTTCTTTGCTACTATTTTAGCACCTATTTCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.((.)).)).).((.)).((.)).((.)).
DE0610	GCGGATCCAGACTGGTGTACAAATCTCGTAACGTGTTCTATTCTGTTCCCCCTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).
DE0611	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGGTGCGGTATTGCGACGTGCTCTTGATCTCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).(((((.))))).((.)).
DE0612	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAATGTCCACGCATTTATCTCCTCCCTCATGTTTCGGGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).
DE0613	GCGGATCCAGACTGGTGTGATTTTGAACGGAATTGTATATTACTCGTCTACCCGTAGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).
DE0614	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAATCATTCAACGTTACTTGTGGTACTCACACTCTCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).
DE0615	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGCAAGGTTATATTACATCTAAATCATACTCCACAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).(((((.))))).((.)).
DE0616	GCGGATCCAGACTGGTGTCAAAAGTTCCCATGTTGCGCGTTGCTTTCAGTGTATTATGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).
DE0617	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTCAATTCGGGTTTGTAGTATTAGTACTTGTGTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.((.)).)).).((.)).((.)).((.)).
DE0618	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTATCAGTGTGCGTCAGGTATCAAAGTAGTCTCATCCTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).(((((.))))).((.)).
DE0619	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGCTACCGGTTCATTTGCTTCGTATATCTCTGTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).((.)).((.)).((.)).
DE0620	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAGTCTTGATTGTGTGCGTTTACCAAACCTCAGAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((((.))))).((.)).((.)).((.)).
DE0621	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTTCCTTCCGTGACTTGGACTGATATTTATGCCCTAAAGACAAGCTTC((.)).((.)).((.)).((.)).((.)).

8. APÉNDICES

DE0622	GCGGATCCAGACTGGTGTATCTTTCTATACTATTTCAGCAGTGCTTCCCTTGCCCTCAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((((.....))))) (((((.....)))))
DE0623	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGTTAATGTTCCATTGCTTAGCTAGTTAACAAACTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) ((((((.....))))))) (((.....))) .
DE0624	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCCGCGACTAGTCATTATACTTCGCCTATCCCCGACTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((((.....))))))) (((.....))) (((.....))) .
DE0625	GCGGATCCAGACTGGTGTGACAGTTATTTTCTAAGCGTACTCCACTTCATGTTACAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) ..
DE0626	GCGGATCCAGACTGGTGTATCGTGCGGATTCATACAGGCTTCATTATGCATCATTGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((((((.....))))))) (((.....))) .
DE0627	GCGGATCCAGACTGGTGTAAAGTTTCCACAAACCTCGTCTTGTTAAGTGCAGCCGTATAGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((((.....)))))) (((.....))) ..
DE0628	GCGGATCCAGACTGGTGTACTGTATTGTTTGTAGTAAGTTATTTAAGGAGTGTTAGTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) .
DE0629	GCGGATCCAGACTGGTGTATATAAGTAAACCCACGAATACTGCACTTCCAATTTTCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) ((((((.....))))))) (((.....))) .
DE0630	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATTATTATCAACCCGTCTTATTAGCTCATGCAATCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
DE0701	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGCATCATTAGCTCTTCTGTTTCTTGTTCCTTTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
DE0702	GCGGATCCAGACTGGTGTGTATACGTGGTATTCTGTTAGATGTGATGTGTTTATCTTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) ((((((.....))))))) (((.....))) .
DE0703	GCGGATCCAGACTGGTGTAGGGCACTCTACGCGTTTAGTCTCCTTCTCATGCTCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) ((((((.....))))))) (((.....))) .
DE0704	GCGGATCCAGACTGGTGTGGGTGCTATGGGTCTTCACACGAAAATTTGCTCTCTACTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((((.....))))))) ((((((.....))))))) (((.....))) .
DE0705	GCGGATCCAGACTGGTGTTCATTTACAATCCTTCATTTATTTTGTGGAGTTTCTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
DE0706	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGCCTGCGGACGTAACGATTAAATATCTCCTATCGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
DE0707	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATGTTAATATGGCTACGGGTGATGTGCCTTCTACCTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
DE0708	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCGGGTGTAAATGCTGTAAAAGTGGTTCGTTATAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) ..
DE0709	GCGGATCCAGACTGGTGTATGTTCAACGCCTTGGGTCTATTAATATATTAGCCACAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .
DE0710	GCGGATCCAGACTGGTGTGATTTCTTATTATTCTGTATTTAATCTCGTTTCTTGTATGGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) ((((((.....))))))) (((.....))) .
DE0711	GCGGATCCAGACTGGTGTGCATCTCCGAGGTACGTCTCATTTTCAGTTATGATTTTGGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((((.....))))))) (((.....))) (((.....))) .
DE0712	GCGGATCCAGACTGGTGTGGCAGAGGCAAAATGGGTATTCAATCTAACAACCTCCCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))) (((.....))) (((.....))) ..
DE0713	GCGGATCCAGACTGGTGTATCTAATTTCCAGGTCTCTCCGAGTTATGTATTGGGGCTGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((((.....))))))) (((.....))) (((.....))) (((.....))) .

8. APÉNDICES

DE0714	GCGGATCCAGACTGGTGTATAATGTGTCCTATTAAAAAAGAACCCCATACGTTACTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0715	GCGGATCCAGACTGGTGTGGAGATGGTATCTATCTGAGTTTCTGGTGATCTCTCTGCCCCTAAAGACAAGCTTC(((((((.....)))))).....(((.....))).....
DE0716	GCGGATCCAGACTGGTGTACTATACGACACAATTACAGGGTTATTCGTTTTATCCCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0717	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTGGTTAGAAATATAGCATAATTATATTTTTAGTCAGCCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....
DE0718	GCGGATCCAGACTGGTGTAGCTCTTGTGGAGTGCTGCTATTAAATATTCTACGTTGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0719	GCGGATCCAGACTGGTGTTCATTCGATTTACATAAAGCGTTATTCGCCGTTATTAAAGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0720	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGTTTGGTTCGTCTCGCGTTGCATGTTCCCTCCCTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0721	GCGGATCCAGACTGGTGTGCGGGGGACTCGCTCTGTTTTATGCCTTAATCAGTTCCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0722	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTAGTGAAGTGTATTAAAGAACTCCTTCATCGTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0723	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTCGGGTGTAAATTGCTGTAAAAGTGGTTCGTTTCATAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0724	GCGGATCCAGACTGGTGTGACTTCCATTCTATCATGTTTCCTTATTCGTTGTGACCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0725	GCGGATCCAGACTGGTGTAACTAGTGGCTTCCAAGATTGCGATTTTCTCTCGCCGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0726	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTGCGGATTACTACAGACGTCCGGCAGTTCTTTATTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC (((.....))).....(((.....))).....(((.....))).....
DE0727	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTATGTCGATTATATCTCTGCTACCTTTGCTTCCCGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0728	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATTAAAGCGTCTCTCGCGGAGGACCGCTTCTATCTCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0729	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTATTTTACAATTCTGCCCTCTTTACATAGGAAGGAACGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0730	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTGTCTTAGTTACCTATCTATTATATGCTATTCTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0731	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTATGCTTTGCTCTCGCTGCGACCTGCTCAAGTTTATAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0801	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTTCGTTTCCATTTCTTAGTCTGCTACTGTTATCCTGCCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0802	GCGGATCCAGACTGGTGTACTAATGCCTGCAATCCTTCGCTTTTACCTCCACTTTGAGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0803	GCGGATCCAGACTGGTGTGCCAGTGTCTCGTCTCCGCTTTGGACGGAATTGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..
DE0804	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTAGTCTACATCATACTACTTTACACGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))..

8. APÉNDICES

DE0805	GCGGATCCAGACTGGTGTACTTTTTTCGCCCTTTAAAGTCTAATTTACAGAATTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((...)))...((((.....)))...(((.....))).....(((.....)))
DE0806	GCGGATCCAGACTGGTGTAACTCTCCGTCCCTCTAAGTTTTTCGGCTTTCCTAATCTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC ((((.....))).....(((.....)))
DE0807	GCGGATCCAGACTGGTGTATTTGTTTCCTCAATTCCTAATTGTGCGACTGATCTTATGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((...))).....((((.....))).....(((.....)))
DE0808	GCGGATCCAGACTGGTGTATACTGGTACATTCCATGCGGTTGTTTGGACCTATAGACAGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0809	GCGGATCCAGACTGGTGTGGTTTCCTTACTGAGTGGCGAGCGATTATAGTTAAATGTGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0810	GCGGATCCAGACTGGTGTGAATTTATCACCATTTCGCTCATTTTCACTCGTCATGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....)))
DE0811	GCGGATCCAGACTGGTGTGTCAGCTAATAACGCTCTCGACATTCCATTCTCTCGTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0812	GCGGATCCAGACTGGTGTGACCATGGGTTATGTCGATTGGCTACGCTAATTTAATGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0813	GCGGATCCAGACTGGTGTAAAGCGCTAGCTCCTCTATGTCCCCCTTTGCAGACCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((...))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0814	GCGGATCCAGACTGGTGTAGAGTTGCTAAGAATCGTCTTGAATTTTATTTTGCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DE0815	GCGGATCCAGACTGGTGTATCCTATGTCATGGCCTTCAGTTCCGTATCGCTCTCGTTAGCCCTAAAGACAAGCTTC .((((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0816	GCGGATCCAGACTGGTGTGAATGCTGGGGATACGTAGGCTGCTATCCATTGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0817	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGCTTTATTGTCGTGAGCCATTTATTGTGACTTTTCTCGCCCTAAAGACAAGCTTC ..(((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0818	GCGGATCCAGACTGGTGTGTTGTTGTTCTCGTCTCCGTTTCTCTTTTATACTTACGCTTTGCCCTAAAGACAAGCTTC .((((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0819	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGGTGGTGCTTCTCGAAATGTCCTTTTATACTCGGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DE0820	GCGGATCCAGACTGGTGTATTTTCTCCGTAGTGTTCTCGAGTAACCTCGTTTGGCCCTAAAGACAAGCTTC .((((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0821	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAGTATTTTCGACTTAGTGCTCGTTCATGTTATTCTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((...))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0822	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTATACTCAGTTAGTGCCGAGGGTTTTTTTGTTCAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....((((.....)))
DE0823	GCGGATCCAGACTGGTGTGTAGTATTTTCGACTTAGTGCTCGTTCATGTTATTCTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((...))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0824	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGGTGGTGCTTCTCGAAATGTCCTTTTATACTCGGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....)))
DE0825	GCGGATCCAGACTGGTGTGAGGTGGTGCTTCTCGAAATGTCCTTTTATACTCGGGTGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....))).....(((.....)))
DE0826	GCGGATCCAGACTGGTGTGTACCGGTGAGCTCATTGCCGGTGACTTATTTTCTAGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....))).....(((.....)))

8. APÉNDICES

DE0827	GCGGATCCAGACTGGTGTATGCTACCCGGGTACTTTTCGTCACCTGACTCCTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....)))..
DE0828	GCGGATCCAGACTGGTGTGACTTTGTTCCCTGGTACGTGCTCATGACTCGTTGGGGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....)))..(((.....)))..(((.....)))..
DE0829	GCGGATCCAGACTGGTGTATCTTTTGCATGACGACTATTTACTAACTTTTCTCTAGGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....))).....
DE0830	GCGGATCCAGACTGGTGTGCTTTTGTATTTTATATCAACTGTGGATAATCGCCCTGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....((((.....)))).....(((.....)))..
DE0831	GCGGATCCAGACTGGTGTAACTCTTCCATGCTTATATGCCTCATCGTGGGAACTCGCCCTAAAGACAAGCTTC(((.....))).....(((.....)))..(((.....)))..
DE0832	GCGGATCCAGACTGGTGTAAATGGCACGCGCGACTCCGCCACATGTTTGATTCTCAAGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....)))..((((.....))).....(((.....)))..
DE0833	GCGGATCCAGACTGGTGTGAAGCGGATTTCTACCTATTTTAATATTTTCGTTCTGCGGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....)))..(((.....)))..
DE0834	GCGGATCCAGACTGGTGTAGTTCTCTCTGTGCAATTGTTGATTTTCCTGCTTTTCGCCCTAAAGACAAGCTTC((((.....))).....(((.....))).....((((.....))))...

Nombre	Secuencia 5'-3'
RE0101	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUGGCUCUGCUUGGCCAACCUGGUCGAUUUCCGUUCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((((((.....))))))..(((((((.....)))))).....
RE0102	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUUGUAUUAUUAGUUAACGCGUCUACCCGACGGUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....(((.....))).....(((((((.....))))))..(((.....))))..(((.....))))..
RE0103	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUGGCUGAAUAUCGAUAUUAUUAUUCUCUUUCGUGUGCCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....))))..(((((((.....)))))).....
RE0104	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUGAGCUGUCUGUGAGCUACGUGUCUCGCUUUGCCGCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....(((((((.....))))))..))))))..(((.....))))..
RE0105	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUUUACCACCGAAUGGCUAUGUAUUCUUUUGUGUGGCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....))))..(((.....))))..(((((((.....)))))).....
RE0106	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGCAUUCUUUAAUGGUAAGAUGUUUACGUGUUUACGCGGUGAGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((....(((.....))))..(((((((.....))))..))))..
RE0107	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCCAUCAUUGUUUCUCCCCACACUGUUUUUGGAUGGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((((((.....))))..(((((((.....))))..))))..
RE0108	GCGGAUCCAGACUGGUGUCACGUCAGCGUUACCGCCUGAAUUCGACUUUCUACCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((((....(((.....))))..))))..
RE0109	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCGGGCCCUUCUACCGCCUCAAGUGUAGUGCGGCACCUUGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((((((.....))))..(((((((.....))))..))))..
RE0110	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUGGCGACCACUUUCGAGGGUACUUUAUUAUCCCGAUUGCAGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((....(((.....))))..))))..(((.....))))..
RE0111	GCGGAUCCAGACUGGUGUUACAGAGCAGGCUUUAAUGUAUAAAUUUUGCGGUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....(((.....))))..(((.....))))..(((((((.....))))..))))..

8. APÉNDICES

RE0112	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUGCGAACGCCUGUACCAUUCGUUUUAUCCCGCACUUGCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0113	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGUCGAAUGGGAUACAGCCAGUGGUAGUGGAGAAUUUAUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0114	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAGAUUGAGCUAUCGCCGGUGCAUCUUGUUAUUCGUCCGGGCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0115	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUGCCGGUGCAGUUGGGCGUGCUCGGAUUGGGUAUUCGGGCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))).....(((.....)))).....
RE0116	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGAAAGACUGCUACUGCCGUUCCGAUCUCAAGUUCUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))).....(((.....))).....
RE0117	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUCUAUUAUCUAAGAGCGUGUCGUUCGUUAUGACAAUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0118	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCACGGGGUUGGCCUUUAUUAUGUAUGUGGUUCGGGCCUAAAGACAAGCUUC (((.....))).....(((.....)))).....
RE0119	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAGCGACUCGCAGUCGCACGUGGCCGAACGUUUUGUGCCGCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))).....(((.....))).....
RE0120	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUAAUAUCAUUAUGAGAUUUCGUUGCAUUAACAUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0121	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGUGCUGUCGUUGCUUAAUCAAAGUUAACGUUCGUGAUUGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0122	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUACGGGAAGUUAUUAUGAUAGCUCUGCUUAAUGUCAGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....))).....(((.....)))).....
RE0123	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUGUACAGAUUUAUGACUUUAACAGCAAUCAGCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0124	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUUCAGGUUGUAUGAGUAUAACGUUGGUUAUUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))).....(((.....))).....
RE0125	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGGUUACAAAGCUUUGCUUCAUCCGAUACCUUUGCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0126	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUGUAAUAUCAUUAUGAGAUUUCGUUGCAUUAACAUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0127	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAAAGACAACCUUCCGCGUAUCAGUUUGUUAUUGCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0128	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGGUUAUUCUGAGCAUCUCCGAUUAUCGUCGCCGGCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0129	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAGCGACUCGCAGUCGCACGUGGCCGAACGUUUUGUGCCGCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))).....(((.....))).....
RE0130	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCUGGCUACUUGCGGUGUCGUCCCGUCGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.....(((.....)))))).....(((.....))).....
RE0131	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUUCAGGUUGUAUGAGUAUAACGUUGGUUAUUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))).....(((.....))).....
RE0201	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGGAACGAGUUAUACGACGUUGUGGAAUUCUCUCGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))).....(((.....))).....
RE0202	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGCCUACUGUAAUUGCGUGCAGAAUGUGCCAUGUUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....))).....(((.....)))).....

8. APÉNDICES

RE0203	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUCUACUGUCCGGCUUUACAUAUACUUGUCUUUCUGUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.(.(((.(....)))....)))....(((.(.(((.(....)))....)))....))....
RE0204	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGAUUAUGGGGCGCAACUUCACCAAUCUGGUUAGCUGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0205	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAGUUUUGCCGCGUGAGAAUAAGAGAGAUACACUCAUCUGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0206	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCGACCGAUGGACUCACAUGACGCCCUGUGUACGGUUGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0207	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGAUGUGUGUGACUGGCACGCGGUCGUUAAUGUUCGACUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0208	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGAUUAUGGGGCGCAACUUCACCAAUCUGGUUAGCUGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0209	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCUUUGUCUCGUCGUUCCACUCUCAGGCUUUGUUCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0210	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUACUACCAGACCCGGCUAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0211	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUCUUUGUCUCGUCGUUCCACUCUCAGGCUUUGUUCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0212	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUUAUGCUUGAGUCUACUCCUUGGCUUCUUGAGCUUUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0213	GCGGAUCCAGACUGGUGUACCAUACAGUACCUCUAUCUUUUUCUUUGCUGCGCAUACGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0214	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCUAUGGGGUCAUUGUUUAUGCGUGUUGAUCACGUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0215	GCGGAUCCAGACGGGUGUACGUUACAUGUAGUGAGCUCGCAUUUCUUCUGGUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0216	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUUGCGUACGUUUUACCAUGGUUCGGUUGUUUUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0217	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGAUUAUGGGGCGCAACUUCACCAAUCUGGUUAGCUGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0218	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUACUACCAGACCCGGCUAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0219	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCCGGUGAGUCCUGCGUUGGGGCGCCGAGCUUUAUCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0220	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAUGAGUGCACGGUCAAUGACCUUUAACGCAUUAUUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0221	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAUGCUUCUACCGGCUUGUGCCGCCGUUGACAUUAUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0222	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCGUUACUAUGCUUACCGCCGGGCGGGACCGGGACCUGCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0223	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUACUACCAGACCCGGCUAUUUUGAUGUUUUUUUUCUCCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....
RE0224	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUCUGCCUUAUCUGGUGGCCUUUUUUUACGUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.(.(((.(....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....)))....

8. APÉNDICES

RE0225	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUCCCGCGCAUAAGGACCGUUGUCUCAGAACUCAUUGUGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.....(((.....))))).)))((.(.(((.....))))).)).....
RE0226	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCGCGAGUAAGAUUUCAUUAUAGCAAAGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.....))))).)).....(((.....))).....
RE0227	GCGGAUCCAGACUGGUGUAACUGGCUAGCUUGCGGCGUUUCUAGGAUUGCAUUCUGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))..)((.(((.....(((.....))))))..))..
RE0228	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGGAUUUUUGACAUGCCUAUUCAAACACAUCUCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(.(((.....(((.....))))).))..)).....
RE0229	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAACAUUUUCCAGCUGGGGUAUCCUGGAACGCGAGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....(((.....))))).)).....(((.....))).....
RE0230	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAGUUGAAAAGACAUUUCUUGCCUUUUCGUCUGAGCCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.(.(((.....)))..(((.....(((.....))))).))..)).....
RE0231	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUUGAGGUUUGCACUUUAUCCAUAGACUCUACGCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..)).....((.(.(((.....)))..))..)).....
RE0232	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCGGGUAUUGCGGAGCUGUGCUAAUGUGCAGGCCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.(.(((.....)))..))..(((.....(((.....)))..))..)).....
RE0233	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGCUCCUCGACUCAUUGUAUCCGAUUCUGCAUGCCCUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....(((.....))))).))..((.(.(((.....)))..))..)).....
RE0234	GCGGAUCCAGACUGGUGUGACGUGUUAAGAUUGCGCCCGUGGGAUAUCAAUAACUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....(((.....)))..))..))..))..)).....
RE0235	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAUCGCAACGGGCCGUGUCGCGGGUCGUCCUUCUGCGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..((.(.(((.....(((.....))))).))..)).....
RE0236	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUUGAAAGGCCGAUCGUAUGUGCCCCUCCUAUCCUCCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..(((.....(((.....)))..))..)).....
RE0237	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCCGUCGUACCCUGCAGGGGAGACGUUGCGCUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..(((.....(((.....)))..))..((.....))).....
RE0301	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGUCCGAUGGAGGCCGUCGUUGUGAGCUGUUCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....(((.....)))..))..((.....(((.....(((.....)))..))..))..)).....
RE0302	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAGGUUUCGUAACAUGUGACCGUGGCCAUUCCUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..((.....(((.....)))..)).....
RE0303	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCCGGGUGGAGAUAAUCGCUUUUGAUUGAGUUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..)).....(((.....(((.....)))..))..)).....
RE0304	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGAGUUUGGGCUUCGAGUUCGACUGACAGAAACUCCGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..(((.....(((.....)))..))..)).....
RE0305	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAUGCGGCUUACGUUUGCAGAUAGUUAUAUAGCUUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....(((.....))))).))..))..)).....
RE0306	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGAGCCUAUUAUCUAGUCGGGCCGUUGGUCAACUCUCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....(((.....)))..))..))..)).....
RE0307	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGCGGAUUUCGUCGCGGAUGUUUAAUUCUGUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....(((.....)))..))..((.....(((.....)))..)).....
RE0308	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCUAGUUCAAUUGGCCAGGAGACUUGCUUUAUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))..))..((.....(((.....)))..)).....
RE0309	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUCGGCACCAGGUUCCAUACUCGGCUGUAUCAUGGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....(((.....)))..))..)).....(((.....(((.....)))..))..)).....

RE0310	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAUUUUCGUAAGUGAGCGAAUUCGCGUGGGGUUACCUUGUGCCCUAAAGACAAGCUUC (.....(((.....(((.....))))..))..((((.....)))).....))...
RE0311	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAAUCGUUUUCUGGACUCUCCUCCUCUUUGUUCGGGUCGCCUAAAGACAAGCUUC ..(((((((.....))))..))))..))))..((((.....)))).....
RE0312	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGAUGAGUUCGAUCUCCCCGUUCUGAUCGACGUGAGCGUGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(..(..(..((((.....))..))..))))..))..))..)).....
RE0313	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUGUGGUCAAAACGGCCGUUCAUAUCUGGCUAAUGUCGCCUAAAGACAAGCUUC (.....((((.....((((.....))))..))..))))..((((.....))))..))...
RE0314	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAGGUUUCGUAAGAACUGUGACCGUGGCCAUUCCUCGGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....))..))..)))).....((.....))..)).....
RE0315	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCGUCUAAAGUACUUGAGUCGUUCUGCUGUGUCUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(..(((((((.....))..))..))))..))))..)).....
RE0316	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUGUCUGGAAGGGCAAUUUCGUAAGAAUUCUGUGGGGCCUAAAGACAAGCUUC (.....((((.....))..))..))..((((.....)))).....))...
RE0317	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCCGGUUGGAGAUAAUCGCUUUUGAUUGAGUUGUCUGGGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....))..))..)))).....((((.....))))..))))..
RE0318	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGAGUUUGGGCUUCGAGUUCGACUGACAGAAACUCCGCGGCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....))..))..(((((((.....))..))..))))..)))).....
RE0319	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUCUGAUGGCUCUGCCACGCAACGCUUUAUCACAACGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(..(..(..((((.....))..))..))))..))))..)).....
RE0320	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGCUCUUUCUGUUUCGAUGAUGCGCGACAUCUCCGUCGGGCCUAAAGACAAGCUUC (.....))..))..))))..)).....((.....))..)).....))...
RE0321	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCCCGUAGGGCCGGUUAGCAGAUUCGUGUUGUGUGGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(((((((.....))..))..))))..((((.....))..))..)))).....
RE0322	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAUUUUCGUAAGUGAGCGAAUUCGCGUGGGGUUACCUUGUGCCCUAAAGACAAGCUUC (.....((((.....))))..))))..((((.....)))).....))...
RE0323	GCGGAUCCAGACUGGUGUGACAUUGAAGGGUCUCGUUCGUAGUCUGUGAGAUUCGUUGGCCUAAAGACAAGCUUC ((((((((.....))..))..))))..)))).....
RE0324	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCCUCCUUCGUUAGUGAUGGUAAGUAACAUUCGUGGGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(..(..(..((((.....))..))..))..))..))..)).....
RE0325	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGCUACCGAGCACCUCUUUGGACCCGGCGGUACGUUCGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(..((((.....))))..))))..))))..((((.....)))).....
RE0326	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGCUCUAAACAUUGAGAAUACCUAAGCCUGUUCGUUGCGGCCUAAAGACAAGCUUC (.....((.....))..))..))))..))))..))..))..))...
RE0327	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUAGAACAUGUCUGCCAGGCACAUUCGUUUGGGUUCGGCCUAAAGACAAGCUUC ..(((((((.....))..))..))..))..))..))..)).....
RE0328	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAGCGGAGUUAUUCUCCGCUAGGGACUCUCCGCCGCCUAAAGACAAGCUUC (((((.....))..))..))))..))))..)))).....
RE0329	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGUUUAUGACACUCUUGCGCUUUCUGUAUCGUUGUCCGCCUAAAGACAAGCUUC (.....))..))))..))))..))..))..((((.....))..))...
RE0330	GCGGAUCCAGACUGGUGUACCGUGGCGCUUCGAGUUGCGUUUGGGAUCGUCUGGGGCCUAAAGACAAGCUUC (.....((((.....))))..))))..((((.....)))).....))...
RE0331	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCGAUAGAGCUAAGCUUUCACUUCACUUUUGGGUGGCCUAAAGACAAGCUUC ..((((.....))..))..))))..))))..((((.....)))).....

8. APÉNDICES

RE0419	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAACUAAAACGCGUUUGUAAUUGCUGCUUCUCUUGGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((.....)))))))).)))).(((....(((.....))..)))..))....
RE0420	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAUCGCGUGUGAUGUCCCUACUAGCAGGCGGUUGUACGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((....(((.....)))))))).)))).((....(((.....))..)))..))....
RE0421	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCCUUCGGUUUAUGUGCCUCACAUUUGCUGUGACCUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....(((....(((.....))..)))..)))).)))).((....(((.....))..)))..))....
RE0422	GCGGAUCCAGACUGGUGUACUCUUAUCUACAACCAUGAUGUGGGCGUUUACGAUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((....(((.....)))))))).)))).(((....(((.....))..)))..))....
RE0423	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGGGAAAACAUCGGGCUACAGACUUGGUCGCUUUCGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((....(((....(((.....)))))))).)))).((....(((.....))..)))..))....
RE0424	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCGGCAGCUCUGACUCCCAAUAGAGCUCUAUACUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((....(((.....(((.....)))))))).)))).)))).((....(((.....))..)))..))....
RE0425	GCGGAUCCAGACUGGUGUUUGCUAACCUUAUCUCGUCGGUCCAGGGUAGAUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((((((.....))..))))).))....((....(((.....))))..))....
RE0426	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGCUUAGUACGAAGACAUGGGAGCGCCGCUUAAACUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....))..))))).))....(((....(((....(((.....))))..)))..))....
RE0427	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGGGCGUGGGUACUUUUUCGGGCUUCUAAUGUCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((....(((.....)))))))).)))).((....(((....(((.....)))))))).))....
RE0428	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCCUGACUUGACUUAUACCGGUACGUUGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....(((.....)))))))).))....(((....(((.....))..)))..))....
RE0429	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGUCUUCUCUAUUCGCUAUUUCGGCUUCUCCAACGUCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((((((....(((....(((.....))..)))))))).))....((.....))..(((.....)))..))....
RE0430	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGUGCCUCUUCACGCGUGCCGGGUUAUUGCUGGUUGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC(((....(((.....))))..)))).))....(((....(((.....))..)))..))....
RE0431	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCUGCCUAUUCUCCAUUAUGUACCCUUGCCCCCGCAGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((.....(((....(((.....)))))))).)))).))....))....
RE0432	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGCGGUUCUCUGUCUCUACAGUGCUACCACUCAUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((....(((.....(((....(((.....))))..)))..)))).))....
RE0501	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGUCAUUGUGCAGUGUAUCCACCGUAAUCUAGUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((....(((.....(((.....)))))))).)))).))....
RE0502	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAUUUCAGUGACUUGUGUGGUCUGGUUACGCGCUUCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((....(((....(((.....))))..)))).))....(((.....)))..))....
RE0503	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGUUCCGUGUGAGAGUCUCAUGGCGUACAAACUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((....(((.....(((.....)))))))).))....))....
RE0504	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGGUCGAUACAGCUGGAAUCCACUGUGUAGGAAUGCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((((((....(((.....)))))))).)))).((.....)))..))....
RE0505	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGCAAUCUGACGCGGUUGUCUGGACUAUACUUGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((....(((.....))))..)))).((.....)))..))....
RE0506	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGUUACGGGCUAAGUUUUUGCCUUAUCUCUAUUGGGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((....((.....)).((....(((.....(((.....)))))))).))....
RE0507	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCUGCCCUAAUUCGCGUGAUCCAUGCCCGUAAACGUCGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....))))..)))).))....((.....)))..))....
RE0508	GCGGAUCCGAGACUGGUGUGCAGUUGACGUAGAGGUCCAUCUGUUGACCACUGGGGCCCUAAUACAAGCUUC ((.....(((.....))))..))....(((.....)))..))....

8. APÉNDICES

RE0509	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUACAUGUCUGGCCCGGAUGUUGGUCAGCCUACUGCGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((..(((.....))..)))..(((.....))).....
RE0510	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCUUGUUCUGGGCUUUGCGACCAAUUCGUCGGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((..(((.....))..)))..(((.....))).....
RE0511	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCCUACGUCUCUAUGUUCUGCCCCGGGAUGCGCUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....))).....
RE0512	GCGGAUCCAGACUGGUGUGAAGUGAUGUAGUUACAGCAGUAGCCGUUCAAUACUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))..))..(((.....))).....
RE0513	GCGGAUCCAGACUGGUGUACGCGUGUAGGCAUAGUGCCUCGAGUUAUCCUGCGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((.....)))..))..(((.....))).....
RE0514	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGGUGUAUCCUCUAGCUGCGCUUUGGCCAUCGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))..(((.....))).....
RE0515	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGACACCCUCUGUGACCAUGGCGAUUACCGGAUCCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))..(((.....))).....
RE0516	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCAACCGCUAUCGCGCGGAUCUGUGCUUUAUUCGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))..(((.....))).....
RE0517	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGCAUUAUAGUAGUCUUUCUGGUAGAAUGGUUUGUACGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))..(((.....))).....
RE0518	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGGAUCCUGGUCGUCGUAAGCAGCUUUGUCUUCGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))..(((.....))).....
RE0519	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCUAACGUGUCGACCCUGGCCUGCCGAUUCUCUGCGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))..(((.....))).....
RE0520	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCACAUAGAACUCGUCCUUCGUAGUCUGCUUGGUGUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))..(((.....))).....
RE0521	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCUGCCCUAAUUCGCGUGAUCCAUUGCCGUAACGUCGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))..(((.....))).....
RE0522	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGCGCAUCCGGGUCAUGUAUUCUAGUAGGAAUGGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....))..(((.....))).....
RE0523	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUUGUAAGCUUAGAAUUGUUUAGACGGCGUCCUCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))..(((.....))).....
RE0524	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGUUUAACAACUCCUCGCCUAUUGCGUGUUCGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))..(((.....))).....
RE0525	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGUGGUGUUCGGACGUGUUGUCCGUCUGGUUCCGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....))..(((.....))).....
RE0526	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCUGUUCGGGCACAUUCGGGGUGUCUCCGUCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))..(((.....))).....
RE0527	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAUUCUGUGUAAAGCUGCAUGCCUAUGCUUGGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....)))..(((.....))).....
RE0528	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGUCUAUUGUUCAGUACUGUAAAAUUGGCGCGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))..(((.....))).....
RE0529	GCGGAUCCAGACUGGUGUGGGUCAUCGAAACAGAUAAUACGGUUUGCUACUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....))..(((.....))).....
RE0530	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCACGCUUUAACAGCUACGGGCGCCUCCGUCUCCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((.....)))..(((.....))).....

8. APÉNDICES

RE0531	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCAGCUCAAUCGAUUAUUGGACUUGCUUGGGUAUUCGUAACGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.((((.((((.....))))))..)))..(((.....)))).....
RE0532	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUAUGCACUGACAGCACCGAUGAUAUUUCCACAGCGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(....((((.....))))..((.....)).....))..
RE0533	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUAUAACACGGCACUAUUGCUGCAUCCGUUCCAUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((..(((.((((.....))))))..)))..)))..(((.....))))..
RE0601	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUAUUAUCGUAUAUCGUCCAUACCUCUGUACUCUGCACGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((..(((.((((.....((((.....))))..))))))..)))..)))..
RE0602	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGCAAGAAGACCGUUGCGGAUAGUUUGGUUCGUUCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((((((((((.((((.....))))..))))))..))))..)))..
RE0603	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGGAUAUGUGGUCUGUAAGCGUCCAUCUUAACCUUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(....(((.((((.((((.....))))))..))))..)))..))..))..
RE0604	GCGGAUCCAGACUGGUGUACAUCGCGACUCUACUUGUUCUCCAGCAAACUUGUUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....))))..((.....))..))..))..(((.....))))..
RE0605	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUUCUGUUGCUGUAUAUUAUGUGGAGCUUCCCGUUUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((..(((.....))))..)))..(((.....((((.....))))))..)))..
RE0606	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAGGUAGAACAUGCACUAUAAGGUGAUGCGUGCGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(....(((.....))..))..(((.....((((.....))))..))))..))..
RE0607	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGUAUGGUUGAAUUUGAAGCUCUUCUGGUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((.....)).(((.....((((.....))))..)))..)))..))..
RE0608	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUAUGAUCAACGUUUCUGGAUGGGAUGUUCGUCCUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(....(((.....((((.....))..))))..)))..))..
RE0609	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUUAAGCAUAUCGCGGCUAUCAGUGCGAGAAUUGUUGUUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((((.....))))..(((.....((((.....))))..)))..)))..
RE0610	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCCUGGUUCUGCUUCUCCGUAAUGCCUACAUAUGCGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....))..)))..)))..(((.....((((.....))))..)))..
RE0611	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCAGCGACUUAACUGCUUUAACGAUGCUUUUGUGGGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((.....))..))..(((.....((((.....))..))))..)))..
RE0612	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUUCGUAUGCUUAUAUCCAUAUACCUCGCCUCGUCCGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....((((.....))..))))..)))..)))..
RE0613	GCGGAUCCAGACUGGUGUAAUUAACGAUCGGGUGUGUCUCUUCUCCCGCGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....(((.....((((.....))..))))..)))..))..))..
RE0614	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAAGCGUAAAUUCGCCACGUAAUACAGGUGUUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(....(((.....((((.....))..))))..)))..))..))..
RE0615	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUACUUAACCUUAUCGAGGCGAUUUCUGAGGAUCUGUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....((((.....((((.....))))..))))..(((.....))))..))..
RE0616	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUUCGUAUUAUUGGUAAGCCGGCGUAGUGUCUCCUCUGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(....(((.....(((.....))..)))..(((.....))..))))..))..
RE0617	GCGGAUCCAGACUGGUGUAACCGGACUAUACGACAGGUGCUUAUAUCUAUCGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((.(....(((.....))..))..(((.....((((.....))))..))))..))..
RE0618	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUAUUCGUCAUUGCUUUAACUGUGUCCCUACCCGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((((.....((((.....((((.....))))..)))..)))..)))..
RE0619	GCGGAUCCAGACUGGUGUGACAAAGGGUCUCGAAGCGAGAUAGGUGGUAAGCUUCGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((((.....((.....))..)))..(((.....((((.....))))..))))..

8. APÉNDICES

RE0708	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGUCAUUUCUCGGAAGCCGUUAUGAGUCUGUCGCGGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...(((...)))...)))))).))))).(((.....)))
RE0709	GCGGAUCCAGACUGGUGUGUUUAGGUAAGUUCUCUAGGGUACCCUACCCCGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((...))).....(((...(((...(((...)))...)))))).))...
RE0710	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGGAGUACCUCAGGAAUUCUAAUUGUUUCCUCCUGUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....)).....
RE0711	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUUGGUGUUGGGCGGACCAUGCAAACGCUGCAUUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((...(((...)))...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....)).....
RE0712	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCGGUUGCAAGCGCGUUCUGAUUAUUGACUUGUUUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...)))...(((...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....
RE0713	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUCCGAUCGCGAGCGGUUUCUUAUACUACGGUGCUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((...(((...(((...)))...(((...(((...)))...)))))).)).....
RE0714	GCGGAUCCAGACUGGUGUCCAUUCUUAUAGUUCUUAUUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((...(((...)))...(((...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....
RE0715	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCGAACAGCGUCUAUUGCCAGUCUGGGCCCUUUGUACGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((...(((...)))...(((...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....
RE0716	GCGGAUCCAGACUGGUGUGCUGAUUAACCCGGUACUGCCGUGUCUCUGUGGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....(((...(((...)))...)))).....
RE0717	GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUAUAGCCAGCCUAGUGAACCAGCGCCUUCGCGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((...(((...(((...)))...))))).)).....(((...(((...)))...)))).....
RE0718	GCGGAUCCAGACUGGUGUAUCAUAUAGCGUCAGCCUAAACCCAUUGGUGUAGUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((...(((...)))...))..(((...(((...)))...))))).)).....
RE0719	GCGGAUCCAGACUGGUGUCUCCUCAGGUCACGCCUUCUCGUUAGACUGGCUUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...)))...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....)).....
RE0720	GCGGAUCCAGACUGGUGUCAGAGGAAGUACACGCACUCUGGAUGUGGCUAGUCGUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..(((...(((...(((...)))...))))).)).....(((...(((...)))...)))).....
RE0721	GCGGAUCCAGACUGGUGUGACCGCGGUUAUUUCUGUUGUCUUCGUGGGGUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((...)))...(((...(((...)))...))))).)).....
RE0722	GCGGAUCCAGACUGGUGUUGUACUUUAAGGUCCUGGGUACCAAUUCACUUCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((...)))...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....
RE0723	GCGGAUCCAGACUGGUGUUACAGCGUCCACUGUGGUGGUGAGGAUCUGCGGUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...)))...(((...)))...))))).(((...))).....
RE0724	GCGGAUCCAGACUGGUGUAGAUUCCCGGUUCUUGGUAGACUAUCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((...)))...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....
RE0725	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGUGUGAUUGAUAAGAGAUAUACCGGAUUCGCCUGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ..((...(((...(((...(((...)))...)))))).)).....
RE0726	GCGGAUCCAGACUGGUGUUCGGUUAUGUCUAUGUGUGGAGAUUAGGUUUGUUGGGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...)))...)))...(((...))).....(((...(((...)))...)))... GCGGAUCCAGACUGGUGUUAUUGUUAAGCGCUUAGUCCAGUUAUACUAGCUAUCGGGGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((.....(((...)))...(((...)))...)))...(((...))).....
RE0727	GCGGAUCCAGACUGGUGUCGCAUCCAGACCAAGGCCUCGCCAGACACACUGCCGCCCUAAAGACAAGCUUC (((...(((...(((...)))...))))).)).....
RE0728	GCGGAUCCAGACUGGUGUGACAGGUUUGUGUCUAUCGGAUGAUUAUUGUUGCGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...(((...)))...))))).)).....
RE0729	GCGGAUCCAGACUGGUGUGACAGGUUUGUGUCUAUCGGAUGAUUAUUGUUGCGUGCGGCCCUAAAGACAAGCUUC ((...(((...(((...)))...))))).)).....

[illegible]

8.4. APÉNDICE IV

Tabla A1. Datos de la concentración promedio de aptámeros de DNA (en nM) recuperada en los ensayos de ELONA frente a Ebp1, acoplado a una qPCR. Los valores mostrados se han obtenido empleando como DNA molde inicial para el ELONA concentraciones de 5, 8, 20, 40, 80, 125, 250 y 375 nM. Cada concentración se ensayó por triplicado en el ELONA y por duplicado en la qPCR, obteniendo 6 valores de Ct cuyo promedio y desviación estándar (“Desv. est.”) se interpolaron en la recta patrón de DNA en la qPCR.

Aptámeros recuperados (nM)								
		DS0822	DS0830	DE0807	DE0816	DE0820	DE0822	
Aptámeros añadidos (nM)	5	Promedio	6,11x10 ⁻³	4,78x10 ⁻³	3,07x10 ⁻¹	3,35x10 ⁻³	1,28x10 ⁻¹	2,42x10 ⁻³
		Desv. est.	2,41x10 ⁻⁴	8,47x10 ⁻⁵	2,49x10 ⁻²	3,85x10 ⁻⁵	2,07x10 ⁻³	1,96x10 ⁻⁴
	8	Promedio	6x10 ⁻³	5,28x10 ⁻³	3,96x10 ⁻¹	3,71x10 ⁻³	2,15x10 ⁻¹	2,65x10 ⁻³
		Desv. est.	8,33x10 ⁻⁵	1,03x10 ⁻⁴	5,86x10 ⁻²	6,29x10 ⁻⁵	5,64x10 ⁻³	1,45x10 ⁻⁴
	20	Promedio	7,53x10 ⁻³	7,26x10 ⁻³	7,21x10 ⁻¹	4,25x10 ⁻³	6,4x10 ⁻¹	5,63x10 ⁻³
		Desv. est.	1,96x10 ⁻⁴	1,47x10 ⁻⁴	1,07x10 ⁻¹	8,93x10 ⁻⁵	2,03x10 ⁻²	2,33x10 ⁻⁴
	40	Promedio	1,2x10 ⁻²	1,36x10 ⁻²	1,01	7,46x10 ⁻³	9,64x10 ⁻¹	8,55x10 ⁻³
		Desv. est.	2,48x10 ⁻⁴	3,65x10 ⁻⁴	1,26x10 ⁻¹	4,49x10 ⁻⁴	4,62x10 ⁻²	7,32x10 ⁻⁴
	80	Promedio	1,64x10 ⁻²	2,16x10 ⁻²	1,25	1,04x10 ⁻²	1,65	1,15x10 ⁻²
		Desv. est.	4,3x10 ⁻⁴	3,9x10 ⁻⁴	1,27x10 ⁻¹	3,63x10 ⁻⁴	4,81x10 ⁻²	7,76x10 ⁻⁴
	125	Promedio	3,94x10 ⁻²	4,19x10 ⁻²	1,17	1,46x10 ⁻²	1,55	1,94x10 ⁻²
		Desv. est.	9,77x10 ⁻⁴	9,56x10 ⁻⁴	1,05x10 ⁻¹	2,95x10 ⁻⁴	2,61x10 ⁻²	9,7x10 ⁻⁴
	250	Promedio	9,25x10 ⁻²	9,16x10 ⁻²	1,11	4,77x10 ⁻²	1,82	1,01x10 ⁻¹
		Desv. est.	1,68x10 ⁻³	1,3x10 ⁻³	1,52x10 ⁻¹	7x10 ⁻⁴	1,05x10 ⁻¹	1,09x10 ⁻²
	375	Promedio	7x10 ⁻²	2,23x10 ⁻¹	1,23	9,25x10 ⁻²	1,96	1,16x10 ⁻¹
		Desv. est.	1,91x10 ⁻³	5,53x10 ⁻³	1x10 ⁻¹	1,54x10 ⁻³	1,53x10 ⁻¹	8,31x10 ⁻³

Tabla A2. Datos de la concentración promedio de aptámeros de RNA (en nM) recuperada en los ensayos de ELONA frente a Ebp1, acoplado a una RT-qPCR. Los valores mostrados se han obtenido empleando como RNA molde inicial para el ELONA concentraciones de 5, 8, 20, 40, 80, 125, 250 y 375 nM. Cada concentración se ensayó por triplicado en el ELONA y por duplicado en la RT-qPCR, obteniendo 6 valores de Ct cuyo promedio y desviación estándar (“Desv. est.”) se interpolaron en la recta patrón de RNA en la RT-qPCR.

			Aptámeros recuperados (nM)					
			RS0823	RS0825	RS0826	RE0823	RE0828	RE0829
Aptámeros añadidos (nM)	5	Promedio	1,75x10 ⁻³	8,08x10 ⁻⁴	6,95x10 ⁻³	3,35x10 ⁻³	2,47x10 ⁻³	4,26x10 ⁻³
		Desv. est.	8,7x10 ⁻⁵	1,96x10 ⁻⁵	4,22x10 ⁻⁴	2,04x10 ⁻⁴	1,71x10 ⁻⁴	4,35x10 ⁻⁴
	8	Promedio	1,06x10 ⁻³	7,59x10 ⁻⁴	6,54x10 ⁻³	5,22x10 ⁻³	2,64x10 ⁻³	4,51x10 ⁻³
		Desv. est.	3,47x10 ⁻⁵	2,91x10 ⁻⁵	3,55x10 ⁻⁴	3,11x10 ⁻⁴	1,54x10 ⁻⁴	3,35x10 ⁻⁴
	20	Promedio	1,63x10 ⁻³	1,18x10 ⁻³	1,04x10 ⁻²	3,08x10 ⁻³	3,5x10 ⁻³	3,84x10 ⁻³
		Desv. est.	5,54x10 ⁻⁵	4,14x10 ⁻⁵	5,71x10 ⁻⁴	2,18x10 ⁻⁴	2,62x10 ⁻⁴	4,29x10 ⁻⁴
	40	Promedio	1,63x10 ⁻³	8,38x10 ⁻⁴	2,32x10 ⁻²	1,41x10 ⁻²	1,2x10 ⁻²	1,9x10 ⁻²
		Desv. est.	4,5x10 ⁻⁵	1,54x10 ⁻⁵	1,58x10 ⁻³	6,77x10 ⁻⁴	8,82x10 ⁻⁴	1,32x10 ⁻³
	80	Promedio	4,69x10 ⁻³	1,72x10 ⁻³	3,41x10 ⁻²	4,31x10 ⁻²	6,37x10 ⁻²	2,29x10 ⁻²
		Desv. est.	3,21x10 ⁻⁴	7,83x10 ⁻⁵	2,75x10 ⁻³	3,52x10 ⁻³	5,04x10 ⁻³	1,88x10 ⁻³
	125	Promedio	6,8x10 ⁻³	3,06x10 ⁻³	8,73x10 ⁻²	1,1x10 ⁻¹	8,6x10 ⁻²	9,25x10 ⁻²
		Desv. est.	3,21x10 ⁻⁴	4,44x10 ⁻⁵	9,4x10 ⁻³	5,32x10 ⁻³	1,02x10 ⁻²	9,49x10 ⁻³
	250	Promedio	1,42x10 ⁻²	1,64x10 ⁻²	3,44x10 ⁻¹	2,22x10 ⁻¹	1,84x10 ⁻¹	2,39x10 ⁻¹
		Desv. est.	5,77x10 ⁻⁴	7,84x10 ⁻⁴	3,44x10 ⁻²	1,24x10 ⁻²	1,21x10 ⁻²	2,12x10 ⁻²
	375	Promedio	2,37x10 ⁻²	2,31x10 ⁻²	3,42x10 ⁻¹	3,62x10 ⁻¹	3,11x10 ⁻¹	2,96x10 ⁻¹
		Desv. est.	1,07x10 ⁻³	7,48x10 ⁻⁴	2,63x10 ⁻²	3,08x10 ⁻¹	2,56x10 ⁻²	3,51x10 ⁻²